



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Validación de las quinasas de estrés p38MAPKs
como nuevos biomarcadores tumorales. Análisis de
su papel en cáncer de colon asociado a colitis.

Miguel Ángel Martín Serrano

Madrid 2019

Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología
(CNB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Departamento de biología molecular
Facultad de ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Validación de las quinasas de estrés p38MAPKs como nuevos biomarcadores
tumoraes. Análisis de su papel en cáncer de colon asociado a colitis.

Tesis doctoral

Miguel Ángel Martín Serrano
Madrid 2019

Directores:
Ana Isabel Cuenda Méndez
Juan José Sanz Ezquerro

Abstract

Abstract.

Colon cancer is the third leading cause of tumour-provoked deaths. The risk of developing colon cancer is significantly increased in patients suffering chronic inflammatory bowel diseases, such as Crohn's diseases or Ulcerative colitis, along the years. Our laboratory is studying the role of p38 γ and p38 δ in the development of colon cancer associated to colitis (CAC). We have described that the incidence of CAC is decreased in p38 γ and p38 δ -deficient mice. We have also been described that p38 γ and p38 δ have both pro-tumorigenic and anti-tumorigenic roles in tumour development and progression; this suggest that p38 γ and p38 δ could play different biological function depending on the cellular context. We decided to study the role of p38 γ and p38 δ in two different compartments that are important for colon cancer associated to colitis, by using two different conditional knockout mice: The VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (which have a deletion of p38 γ and p38 δ in the intestinal epithelial cells) and the LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (which have a deletion of p38 γ and p38 δ in the myeloid cells). We found that deletion of p38 γ and p38 δ in the intestinal epithelial cells increases tumour formation, with a parallel increase in inflammatory cytokine production and recruitment of monocyte myeloid derived suppressor cells; while the deletion of p38 γ and p38 δ in the myeloid cells decreases tumour formation, and increases tumour cell apoptosis and CD4 $^{+}$ T cells in tumours. We also found that deletion of p38 γ and p38 δ in the intestinal epithelial cells enhance the severity of acute colitis pathology, with increased epithelial damage, inflammatory cytokine induction, and IGFBP-3 and osteopontin production. On the other hand, deletion p38 γ and p38 δ in the myeloid cells protects the intestinal epithelium against colitis-induced damage. Analysis of immune cell populations in LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ mice showed an increase in macrophages, neutrophils and CD4 $^{+}$ T cells in colon during colitis. Together, our results show that p38 γ and p38 δ play different roles in the development of colitis or colitis associated cancer, depending on the cellular type.

Índice

Índice

Índice	1
Abreviaturas.....	9
Introducción.	15
1. La inflamación y el cáncer.....	15
1.1. La inflamación y la iniciación del tumor.....	16
1.2. La inflamación y la progresión tumoral.	17
2. El sistema inmune en la tumorigénesis.....	18
2.1. Papel de la inmunidad innata en la tumorigénesis.....	21
3. El cáncer de colon asociado a colitis (CAC).	24
3.1. Descripción del colon.....	24
3.1.1. Arquitectura del colon.	24
3.1.2. Las uniones intercelulares en las células del epitelio intestinal (IEC). 26	
3.1.3. Los linfocitos intraepiteliales.	27
3.1.4. El sistema inmune innato en el colon.	29
3.2. Etapas del desarrollo del cáncer en el CAC.	31
4. Las p38MAPKs alternativas p38 γ y p38 δ	33
4.1. p38MAPKs.....	33
4.2. p38 γ y p38 δ , inflamación y cáncer.....	34
Objetivos.	41
Materiales y Métodos:.....	45
1. Tampones.....	45
1.1. Tampones.....	45
2. Tratamientos realizados en ratones.	46
2.1. Ratones.	46

2.2.	Modelo de inducción de CAC en ratones.....	47
2.3.	Modelo de colitis en ratones.....	48
2.4.	Irradiación de los ratones.	50
2.5.	Obtención de macrófagos peritoneales.....	50
3.	Métodos experimentales.	51
3.1.	Medida del número y volumen de los tumores generados con el tratamiento de AOM/DSS.....	51
3.2.	Preparación de muestras proteicas.	52
3.3.	Inmunodetección (Western-blot).	52
3.4.	Extracción de RNA.	54
3.5.	RT-PCR Cuantitativa (qRT-PCR).....	54
3.6.	Procesamiento histológico de las muestras de colon.....	56
3.6.1.	Técnica de Schiff.....	57
3.6.2.	Tinción hematoxilina-eosina.....	57
3.6.3.	Inmunofluorescencia.....	58
3.6.4.	Ensayo de proliferación celular.....	59
3.6.5.	Detección de células apoptóticas por la técnica de TUNEL.....	60
3.6.6.	Microscopía electrónica.....	61
3.6.7.	Análisis histopatológico.	62
3.7.	Análisis de las células infiltradas del sistema inmune.....	62
3.7.1.	Disgregación de las células tumorales.....	63
3.7.2.	Disgregación de las células del epitelio intestinal.	63
3.7.3.	Citometría de flujo.	64
3.8.	Array de proteínas.	66
3.9.	Ensayo de permeabilidad intestinal.	67
	Resultados.	73
1.	Papel de p38 γ y p38 δ en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis.....	73

1.1.	Caracterización de las líneas de ratones KO condicionales VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$	73
1.2.	La incidencia de tumores generados es mayor en los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y menor en los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ comparada con los WT.	77
1.3.	p38 γ y p38 δ regulan la proliferación y la apoptosis de las células tumorales.	81
1.4.	p38 γ y p38 δ controlan el reclutamiento de células del sistema inmune en los tumores de CAC.	83
1.5.	p38 γ y p38 δ modulan los niveles de expresión del mRNA de diversas proteínas relacionadas con el desarrollo de CAC.	88
2.	Papel de p38γ y p38δ en la colitis ulcerosa.	90
2.1.	Los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan mayor índice de inflamación, más úlceras y de mayor tamaño que los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y los WT tras el tratamiento con DSS.	90
2.2.	La permeabilidad del epitelio intestinal en los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ se incrementa en respuesta al tratamiento con DSS.	94
2.3.	Mecanismos celulares relacionados con el recambio y reparación del epitelio intestinal.	100
2.4.	Análisis de las poblaciones del sistema inmune infiltradas en el colon a día 5 del tratamiento con DSS.	102
4.3.	La infiltración de neutrófilos y macrófagos es mayor en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS.	102
4.4.	El porcentaje de macrófagos M2 infiltrados es menor en los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS.	104
4.5.	Los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan más IELs CD4 ⁺ y menos IELs CD8 ⁺ que los ratones WT y los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$	106
2.5.	Niveles de expresión de mRNA de diversos genes relacionados con el desarrollo de la UC.	109

2.6. Análisis de la expresión de proteínas implicadas en inflamación tras el tratamiento con DSS.....	112
Discusión.....	121
1.1. p38 γ y p38 δ regulan negativamente la tumorigénesis en el epitelio intestinal y positivamente en la línea mieloide.....	121
1.2. La eliminación de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal supone un mayor reclutamiento de M-MDSC que podría causar una mayor inmunosupresión del sistema inmune adaptativo.....	122
1.3. La regulación que ejercen p38 γ y p38 δ en la producción de citoquinas depende del contexto celular en que se encuentren.	124
1.4. La delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide aumenta la protección de la barrera epitelial, mientras que la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal la reduce.....	126
1.5. La delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide protege el epitelio intestinal del daño inducido por el DSS probablemente mediante el aumento de células del sistema inmune y adaptativo.	128
1.6. La delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal acentúa el proceso inflamatorio durante la colitis.....	130
1.7. p38 γ y p38 δ regulan la producción de proteínas a distintos niveles.	131
1.8. Modelo de progresión de colitis y CAC en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$	133
Conclusiones.	139
Referencias	147

Abreviaturas

Abreviaturas

AID/AICDA	Deaminasa de citidina inducida por activación
ALP	Fosfatasa alcalina
AOM	Azoximetano
BrdU	5-bromo-2'-desociuridina
CAC	Cáncer de colon asociado a colitis
CCL	Ligando de quimioquinas con motivo C-C
CCND1	Ciclina D1
ChgA	Cromogranina A
COX-2	Ciclooxygenasa 2
CTLs	Linfocitos citotóxicos
CXCL	Ligando de quimioquinas con motivo C-X-C
D-FITC	Dextrano-Isotiocianato de fluoresceína
DS	Desmosoma
DSS	sulfato sódico de dextrano
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
G-MDSC/PMN-MDSC	Células supresoras derivadas de la línea mieloide de tipo granulocítico o polimorfonucleares
H&E	Hematoxilina y eosina
HIF1 α	Factor inducible por hipoxia 1 α
IBD	Enfermedades inflamatorias del intestino
IEC	Células del epitelio intestinal
IELs	Linfocitos intraepiteliales
IFN	Interferón
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IGFBP	Proteína de unión a factores de crecimiento insulínico
IL	Interleucina

ILCs	Células linfoides innatas
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
KC	Quimioatrayente de queratinocitos
KO	"Knockout"
KP	Punto de union "Kissing point"
MAPKs	Quinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDSC	Células supresoras derivadas de la línea mieloide
MIP-2	Proteína inflamatoria de macrófagos 2
M-MDSC	Células supresoras derivadas de la línea mieloide de tipo monocítico
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
MUC-2	Mucina 2
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NK	"Natural Killers"
OPN/SPP1	Osteopontina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PEG2	Prostaglandina E2
PFA	Paraformaldehído
PTX2/SAP	Pentraxina 2
PTX3/STG	Pentraxina 3
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TAM	Macrófagos asociados a tumores

TCR	Receptor de linfocitos T
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
TJ	Unión estrecha "Tight junction"
TLR	Receptores de tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UC	Colitis ulcerosa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WT	Silvestre
ZO	Zona occludens

Introducción

Introducción.

1. La inflamación y el cáncer.

Hace ya casi 2000 años que Galeno ya estableció una relación entre el cáncer y la inflamación, denominada como “bilis negra” por la teoría de los 4 humores de Hipócrates (Hajdu, 2004). Tiempo después, a mediados del siglo XIX el médico y político prusiano Rudolf Virchow fue quien tras encontrar leucocitos en tejidos neoplásicos estableció definitivamente un nexo de unión entre la inflamación y el cáncer (Balkwill and Mantovani, 2001). Con el paso del tiempo esa hipótesis establecida ha sido cimentada gracias al mayor entendimiento acerca de los procesos inflamatorios y el microambiente generado en torno a los tejidos tumorales, y algunos de esos mecanismos moleculares subyacentes han sido descritos ya (Tabla 1) (Grivennikov et al., 2010).

Tabla 1: Datos básicos acerca del cáncer y la inflamación:

- La inflamación crónica aumenta el riesgo de padecer cáncer.
- La inflamación subclínica, a veces indetectable, aumenta también el riesgo de padecer cáncer (por tanto también la inflamación derivada de la obesidad).
- Varios tipos de células del sistema inmune o asociadas a procesos inflamatorios están frecuentemente presentes en los tumores.
- Las células del sistema inmune interactúan con células malignas a través de la producción de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.
- La inflamación participa en cada uno de los pasos de la tumorigénesis, desde la iniciación a través de la promoción tumoral, hasta la progresión metastásica.
- Durante el desarrollo tumoral coexisten procesos anti-tumorigénicos y protumorigénicos, pero si el tumor no es eliminado dominarán los procesos protumorigénicos.
- Las vías de señalización que median los procesos inflamatorios

protumorigénicos son a menudo objeto de ciclos de retroalimentación (por ejemplo la activación de NF- κ B en las células inmunes induce la producción de citoquinas que activan la vía de NF- κ B en las células cancerosas, lo que induce la producción de quimioquinas que hacen que se recluten más células del sistema inmune).

- Algunos factores de origen inmune o inflamatorio son fútiles durante ciertas fases de la tumorigénesis pero críticos en otras.

Tabla 1: Datos básicos acerca del cáncer y la inflamación; Adaptada de (Grivennikov et al., 2010).

1.1. La inflamación y la iniciación del tumor.

Para que una célula inicie la “carrera” tumoral se considera que ha de adquirir cierto número de mutaciones que le permitan adquirir ventajas proliferativas y de supervivencia, y además estas mutaciones han de poder transmitirse a una siguiente generación celular (Grivennikov et al., 2010).

La inflamación juega un papel importante en esta transformación neoplásica aumentando el número de mutaciones, el daño en el DNA y provocando la inestabilidad genómica. Los macrófagos y neutrófilos localizados en el tejido, sobre todo en la fase aguda de la inflamación, liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que provocan daños en el DNA, mutaciones simples o lesiones más complejas en el DNA (Campregher et al., 2008; Mantovani et al., 2008). Este fenómeno se ve reforzado por las células en estado pre-maligno y sus células vecinas, las cuales son susceptibles de la producción y acumulación de ROS y RNS en respuesta a la presencia de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) (Grivennikov et al., 2010). Además el alto ambiente oxidativo debido a la presencia de ROS

y RNS es capaz por un lado de inhibir los mecanismos de reparación del DNA, así como de interrumpir los puntos de control del ciclo celular, o junto con otros mediadores de la inflamación (TNF, interleucina-1 β (IL-1 β), prostaglandina E2 (PEG2)) inducir la expresión del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) que reducirá la expresión de los genes implicados en la reparación del DNA, permitiendo por tanto la acumulación de alteraciones aleatorias en el DNA (Campregher et al., 2008; Colotta et al., 2009; Hussain et al., 2003; Singh et al., 2007).

También se ha visto que ciertas citoquinas entre las que se incluyen TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-13 y TGF- β pueden inducir la expresión de la deaminasa de citidina inducida por activación (AID o AICDA) (Endo et al., 2008; Okazaki et al., 2007), lo cual aumenta la probabilidad de introducir mutaciones en los genes Tp53, c-Myc y Bcl-6 de importante relevancia en el desarrollo tumoral (Colotta et al., 2009).

1.2. La inflamación y la progresión tumoral.

La promoción tumoral discurre desde el punto en que una única célula neoplásica comienza a dividirse hasta la aparición de un tumor primario completamente desarrollado. Para ello es necesario que se promueva la proliferación celular y se reduzca la muerte celular. El crecimiento del cáncer irá acompañado de la pérdida de la estructura normal del tejido. La estructura tisular está controlada mediante señales de proliferación y de supervivencia, las cuales aprovechan las células tumorales en su beneficio. Los mecanismos que emplean las células tumorales para potenciar su proliferación y supervivencia implican alterar los procesos de endocitosis, inhibir los mecanismos de retroalimentación negativa que atenúan el crecimiento y

establecer procesos proliferativos redundantes (Amit et al., 2007; Mosesson et al., 2008; Prahallad et al., 2012; Straussman et al., 2012; Wilson et al., 2012).

La gran mayoría de receptores de los factores de crecimiento convergen en la vía de señalización del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y del factor nuclear κ B (NF- κ B), quienes rigen la proliferación y supervivencia celular, y los mecanismos de diferenciación, adhesión, migración y el metabolismo. STAT3 y NF- κ B están activados en la mayor parte de los tipos de cáncer estudiados. Su activación se debe principalmente a las señales emitidas por las células aledañas al tumor, aunque también puede darse el caso de que se deba a mutaciones por encima de su vía de señalización (Grivennikov and Karin, 2010; Yu et al., 2009). STAT3 promueve la proliferación y la supervivencia celular a través de la sobreexpresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular y de c-Myc, así como de las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl-X_L (Bollrath et al., 2009; Grivennikov et al., 2009; Yu et al., 2009, 2007).

El eje de activación entre STAT3 y NF- κ B se completa con IL-6. La activación de NF- κ B en respuesta a la inflamación promueve la expresión de IL-6, que activa STAT3 en las células cancerosas. En paralelo a estos procesos, la activación de STAT3 desencadena la activación de NF- κ B estableciendo un bucle de retroalimentación (Iliopoulos et al., 2009; Liang et al., 2013).

2. El sistema inmune en la tumorigénesis.

Para la promoción tumorigénica, las células neoplásicas se nutren del microambiente creado en torno a ellas. A la creación de este microambiente contribuyen en gran medida las células del sistema inmune innato y

adaptativo. Una de las principales características de las células cancerosas es su habilidad de influir en las células del sistema inmune a través de mediadores solubles, de esta forma bloquean su función efectora y las reprograman para que adquieran un fenotipo inmunosupresivo, lo que resulta en la adaptación del microambiente en su beneficio. Es la expresión de distintos mediadores inflamatorios y el estado de activación de las distintas células que se encuentran dentro del microambiente las que desequilibrarán la balanza entre la promoción tumoral mediada por inflamación o una adecuada respuesta anti-tumoral (Tabla 2), sin embargo este equilibrio se mantendrá a lo largo de todo el progreso tumorigénico (Bui and Schreiber, 2007; Lin and Karin, 2007; Swann et al., 2008).

Uno de los mecanismos de los que se valen las células neoplásicas para evadir al sistema inmune consiste en el reclutamiento de células T reguladoras (Facciabene et al., 2012) y de células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC) (Gabrilovich and Nagaraj Bharadwaj, 2009) (Fig. I1). Estas poblaciones celulares, a través de la secreción de los mediadores solubles TGF- β (Geissmann et al., 1999; Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009), IL10 (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009; Steinbrink and Jonuleit, n.d.) o IL6 (Menetrier-Caux et al., 1998), interfieren en el reconocimiento antigénico por parte de las células T efectoras (Fig I1).

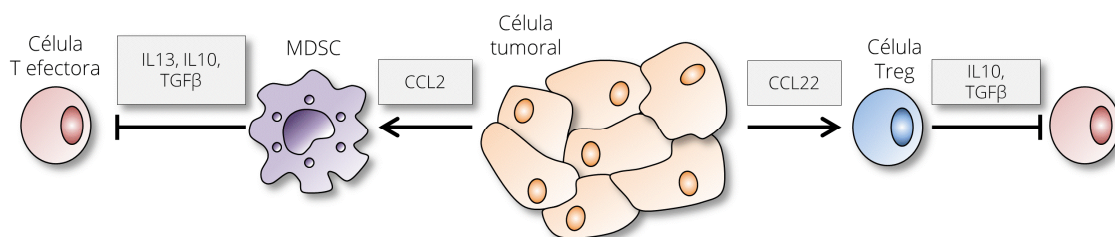


Fig I1: Evasión del sistema inmune por las células neoplásicas: Uno de los mecanismos de evasión de las células tumorales requiere el reclutamiento de MDSC y células T reguladoras, las cuales inhibirán la actividad de las células T efectoras secretando distintos factores solubles. Adaptada de (Elinav et al., 2013).

Tabla 2: Papel de diferentes células del sistema inmune en el desarrollo tumoral		
Tipo celular	Potencial anti-tumoral	Potencial pro-tumoral
Macrófagos, células dendríticas, MDSC	<ul style="list-style-type: none"> • Presentación de antígeno • Producción de citoquinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunosupresión • Producción de citoquinas, quimioquinas, proteasas, factores de crecimiento y factores angiogénicos
Células B	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Producción de anticuerpos específicos frente a los tumores? 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de citoquinas y anticuerpos • Inmunosupresión
Células T CD8+	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad citotóxica contra las células cancerosas • Producción de citoquinas citotóxicas 	<ul style="list-style-type: none"> • ¿Producción de citoquinas?
Células Th2 CD4+		<ul style="list-style-type: none"> • Educación de los macrófagos • Producción de citoquinas • Activación de las células B
Células Th1 CD4+	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuda en su función a los linfocitos T citotóxicos (CTLs) • Producción de citoquinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de citoquinas
Células Th17 CD4+	<ul style="list-style-type: none"> • Activación de CTLs 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de citoquinas
Células Treg CD4+	<ul style="list-style-type: none"> • Supresión del proceso inflamatorio 	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunosupresión • Producción de citoquinas
Células NK (del inglés Natural killer)	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad citotóxica contra las células cancerosas • Producción de citoquinas citotóxicas 	
Neutrófilos	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad citotóxica contra las células cancerosas • Regulación de la respuesta de los CTLs 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de citoquinas, proteasas y ROS

Adaptada de (Grivennikov et al., 2010).

2.1. Papel de la inmunidad innata en la tumorigénesis.

Los macrófagos asociados a tumores (TAM) y las MDSC, son las poblaciones celulares del sistema inmune innato predominantes que conforman el microambiente tumoral (Cortez-Retamozo et al., 2012; Kumar et al., 2016).

Las MDSC son células inmaduras cuya principal cualidad es el gran potencial inmunosupresor que desempeñan en los tumores. Las MDSC son un grupo heterogéneo de células que se subdividen en dos grupos. Por un lado encontramos las MDSC de tipo granulocítico (G-MDSC) o polimorfonuclear (PMN-MDSC), que pueden reconocerse al presentar un fenotipo $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$. Por el otro lado están las MDSC de tipo monocítico (M-MDSC), que se caracterizan por presentar un fenotipo $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$. Las MDSC se generan en la médula ósea. En respuesta a quimioquinas sobreexpresadas en situaciones patológicas de larga duración como infecciones, inflamación crónica o cáncer, migran a los órganos periféricos o a zonas tumorales. En el caso de las neoplasias, los factores que estimulan la diferenciación, progreso y movilización de las MDSC de la médula a los tumores son: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y de monocitos (GM-CSF), IL-6, IL-10 y TGF- β entre otros (Safarzadeh et al., 2018). Mientras que en los tejidos periféricos, las G-MDSC son las predominantes, en los tumores las predominantes son las M-MDSC, aunque estas se diferenciaron rápidamente a TAM, las cuales son la población mieloide mayoritaria en los tumores (Youn and Gabrilovich, 2010; Kumar et al., 2016; Zhao et al., 2016; De Sanctis et al., 2016). Ambas poblaciones de MDSC son reclutadas a los tumores a través de la quimioquina CCL2 (Chun et al., 2015; Murdoch et al., 2004), y además las proteínas S100A8 y S100A9 participan del reclutamiento de las G-MDSC, que a

su vez pueden producir estas proteínas S100 estableciendo un ciclo de retroalimentación (Kowanetz et al., 2010; Ichikawa et al., 2011; Gabrilovich et al., 2012).

La principal actividad inmunosupresora de las MDSC es la inhibición de los linfocitos T, ya sea de manera directa por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o monóxido de nitrógeno (NO), o de manera indirecta por la producción de citoquinas inmunosupresoras (Arg1, IL-13, IL-10, TGF- β) (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009) y la inducción de linfocitos T reguladores (IL-10, TGF- β) (Pan et al., 2010) (Fig. 2). Las G-MDSC producen grandes cantidades de ROS y menos NO que las M-MDSC. Debido a la poca estabilidad de las ROS, la acción inmunosupresiva de las G-MDSC es solo efectiva sobre los linfocitos T cuando están en contacto célula-célula (Nagaraj et al., 2010). Por otro lado, los mecanismos inmunosupresores utilizados por las M-MDSC están basados más en la producción de NO y de citoquinas, por lo que su potencial supresor es mayor que el de las G-MDSC (Cuenca et al., 2010; Dolcetti et al., 2009; Haverkamp et al., 2014; De Sanctis et al., 2016).

Estudios recientes muestran que la actividad supresora que ejercen las MDSC es mayor en los tumores que en los órganos periféricos, en parte porque cambia la relación entre las M-MDSC y las G-MDSC, siendo mayoritaria la población de M-MDSC, y porque el microambiente tumoral promueve sus capacidades inmunosupresoras (Haverkamp et al., 2011).

Como hemos indicado previamente, los TAM son una de las poblaciones de células mieloides predominantes en los tumores, diferenciada a partir de las M-MDSC en respuesta a los estímulos del microambiente tumoral, o a partir de un reservorio de monocitos localizado en el bazo (Cortez-Retamozo et al.,

2012). Según la clásica terminología de distribución de los macrófagos entre M1, o “activación clásica”, y M2, o “activación alternativa”, se considera que generalmente los TAM se encuentran fenotípicamente más cercanos a los de tipo M2, aunque existen evidencias de que pueden actuar como macrófagos de tipo M1 y que incluso pueden cambiar entre uno y otro de los fenotipos M1 y M2 a lo largo de la progresión tumoral (Biswas et al., 2013; Liu and Cao, 2015).

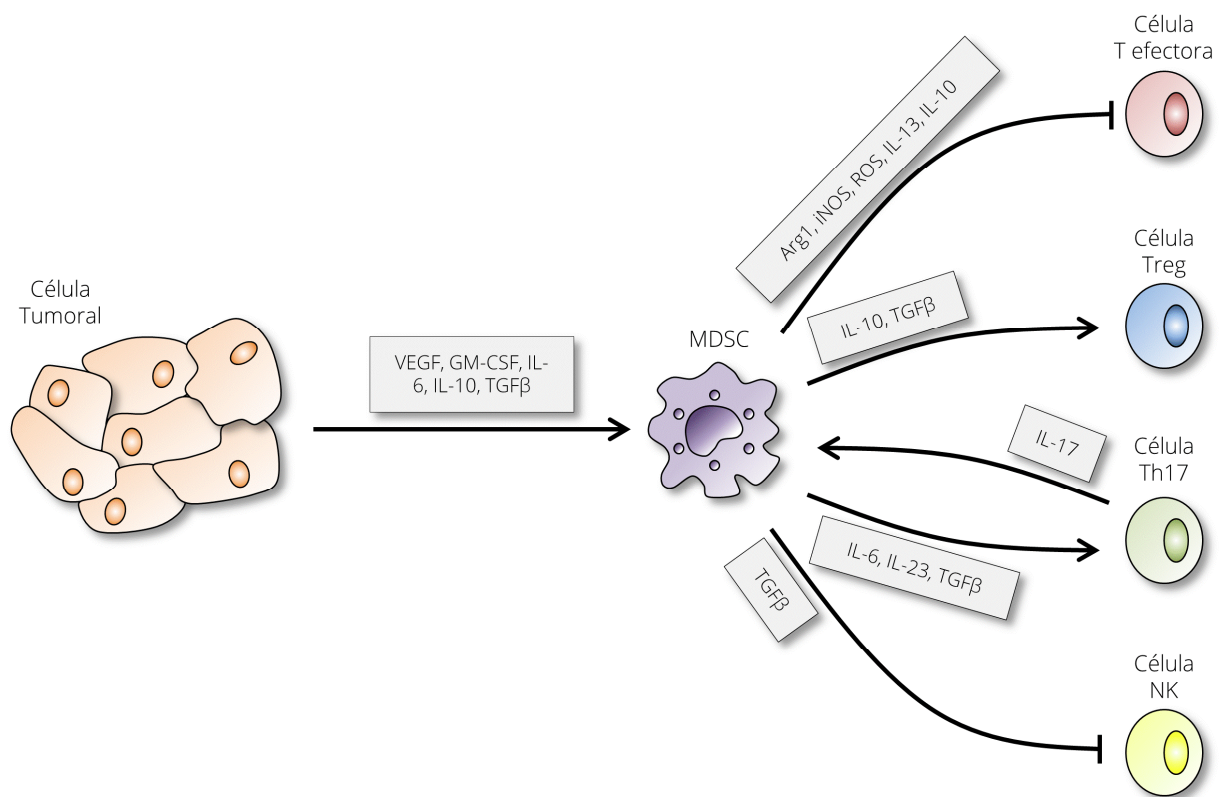


Fig I2: Funciones inmunosupresivas de las MDSC en el microambiente tumoral: Las células tumorales reclutan y estimulan el crecimiento de las MDSC a través de distintos factores solubles. Las MDSC inmunosuprimen las células T efectoras de manera directa o estimulando el reclutamiento y la actividad de los linfocitos T reguladores. Adaptada de (Safarzadeh et al., 2018).

3. El cáncer de colon asociado a colitis (CAC).

Con aproximadamente 1,8 millones de casos nuevos globalmente en el pasado año 2018 y una mortandad de 1 de cada 10 casos, el cáncer de colon es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia, con un 10,2% para ambos géneros, pero el segundo cáncer con mayor mortandad, con un 9,2% para ambos géneros. El mayor número de casos se sitúan en Europa, Australia/Nueva Zelanda y América del Norte (Bray et al., 2018). Cuando se produce un daño en el epitelio intestinal se altera la homeostasis en el colon, y se da una respuesta inmune (adaptativa e innata) acompañada de un proceso inflamatorio. Mutaciones en los genes que gobiernan la barrera intestinal o la regulación del sistema inmune pueden derivar en un proceso crónico (Lasry et al., 2016). Las patologías que comparten esta sintomatología se denominan enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) entre las que los dos principales subtipos son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Choi et al., 2017; Lasry et al., 2016). El riesgo de padecer cáncer de colon en pacientes con IBD aumenta con los años debido a esta enfermedad crónica desde un 2% a un 30% (Eaden et al., 2001).

3.1. Descripción del colon.

3.1.1. Arquitectura del colon.

El colon es la parte más distal del intestino grueso y se compone de 4 capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. La más cercana a la luz del intestino es la mucosa cuya unidad funcional se define como cripta. Una cripta es un invaginación parecida a un dedo revestida por una sola capa de células epiteliales columnares (Fig I3). En condiciones normales, todas las distintas

células que componen el epitelio intestinal, incluidos los enterocitos o las células caliciformes, se diferencian a partir del mismo nicho de células madre epiteliales situado en la parte basal de la cripta, y desde allí migran hacia la parte más apical de la cripta. Este viaje y por la tanto el recambio de las células que componen el epitelio intestinal se da en el plazo aproximado de 1 semana (Barker et al., 2007; Ritsma et al., 2014; Vermeulen and J Snippert, 2014). La mucosa intestinal es una barrera física que separa la luz del colon del interior, protegiendo al organismo de las bacterias que pueblan el intestino y regulando el transporte de nutrientes al interior. Diversas patologías se encuentran asociadas la disrupción de esta barrera, entre ellas las IBD (Odenwald and Turner, 2016).

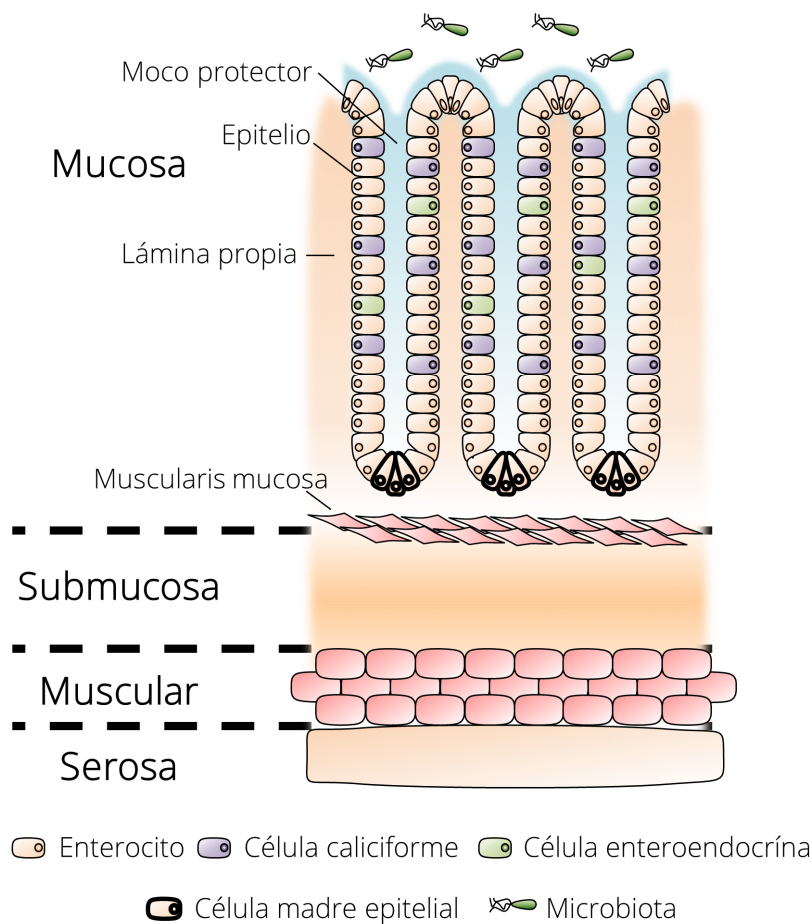


Fig I3: Esquema gráfico de las capas del colon.

3.1.2. Las uniones intercelulares en las células del epitelio intestinal (IEC).

Para el correcto funcionamiento de la barrera epitelial es necesario que el espacio entre las células del intestino se mantenga sellado, función que cumplen las uniones intercelulares (Odenwald and Turner, 2016). Desde la parte más apical a la parte más basal de las células epiteliales, encontramos las siguientes uniones intercelulares: la unión estrecha (TJ del inglés *Tight junction*), la unión adherentes (que ocupa el espacio entre la TJ y el desmosoma) y el desmosoma (Fig I4) (Odenwald and Turner, 2016). La TJ se compone de proteínas transmembrana, proteínas citosólicas y proteínas regulatorias, que juntas componen el punto regulador más importante para el transporte paracelular (Odenwald and Turner, 2016). Curiosamente a través del microscopio electrónico se ven puntos donde la membrana de las dos células epiteliales se desdibuja, denominados *Kissing points*, y son los puntos donde las proteínas transmembrana de ambas células conectan (Guttman and Finlay, 2009; Odenwald and Turner, 2016). Las principales proteínas transmembranas de la TJ son Ocludina y Claudina. La parte citosólica de la TJ la componen proteínas de la familia ZO (*zonula occludens*), las cuales interaccionan directamente con las proteínas transmembrana y a su vez con el citoesqueleto de la propia célula (Guttman and Finlay, 2009; Landy et al., 2016; Odenwald and Turner, 2016). Las proteínas mayoritarias en la unión adherente son las cadherinas, que interaccionan con las cadherinas de la célula adyacente. De las distintas proteínas de la familia de las cadherinas, la E-cadherina es la que parece jugar un papel más importante en el colon, puesto que su delección en un modelo animal lleva a la disrupción de las uniones intercelulares, con un aumento de la apoptosis de las células del epitelio, diarrea sangrante y un defecto en la defensa bacteriana (Schneider et al., 2010) (Fig I4). El último complejo que encontramos es el desmosoma, que

junto a las uniones adherentes, proveen la fuerza necesaria para mantener las células unidas (Odenwald and Turner, 2016).

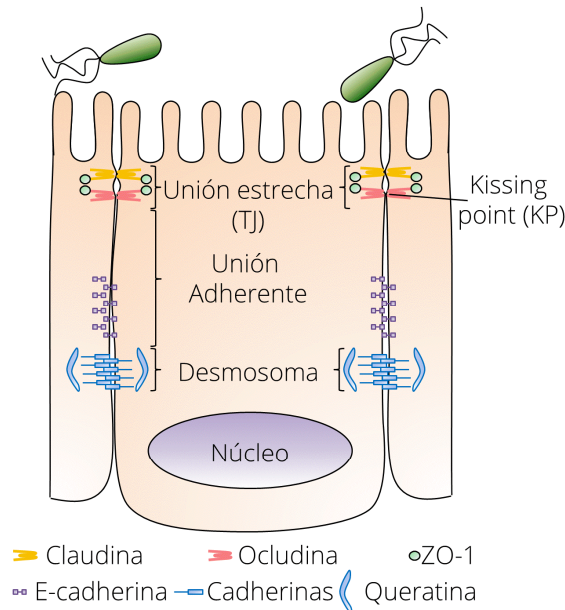


Fig 14: Esquema gráfico de las uniones intercelulares de las células del epitelio del colon.

3.1.3. Los linfocitos intraepiteliales.

Tras el moco que recubre el epitelio y el propio epitelio celular, la tercera línea de defensa con la que cuenta el colon son las distintas poblaciones celulares del sistema inmune innato y adaptativo. De estas, la población celular mayoritaria son los linfocitos intraepiteliales (IELs), que son casi exclusivamente células T. Unas de las principales diferencias de los IELs respecto a los linfocitos en otros órganos periféricos es que los IELs no recirculan, y que la gran mayoría de los IELs expresan el homodímero $CD8_{\alpha}$ ($CD8_{\alpha\alpha}$) mientras que los linfocitos periféricos no lo hacen (Cheroutre et al., 2011; Kumar et al., 2017; Masopust et al., 2010; Suzuki et al., 1998). Los IELs se pueden clasificar en función de si expresan o no el receptor de células T (TCR). La mayoría de los IELs expresa el TCR y a su vez se pueden subdividir en IELs

inducidos (o convencionales) y naturales (o no convencionales). (Cheroutre et al., 2011; Kumar et al., 2017).

Los IELs inducidos derivan de linfocitos T $\text{TCR}_{\alpha\beta}$ convencionales que provienen del timo y al entrar en el epitelio intestinal sobreexpresan $\text{CD8}_{\alpha\alpha}$ (Fig I5). Los IELs CD4^+ al expresar $\text{CD8}_{\alpha\alpha}$ adquieren algunas de las propiedades de los linfocitos T CD8^+ pero sobretodo se les asume un papel regulador y protector para el epitelio en caso de inflamación (Das et al., 2003; Senju et al., 1991; Sujino et al., 2016). Por otro lado los IELs CD8^+ son linfocitos efectores o de memoria en los que la sobreexpresión de $\text{CD8}_{\alpha\alpha}$ les permite ser retenidos más eficientemente en el epitelio y sin la necesidad de reconocimiento antigénico (Huang et al., 2011; Masopust et al., 2001a, 2001b) (Fig I5).

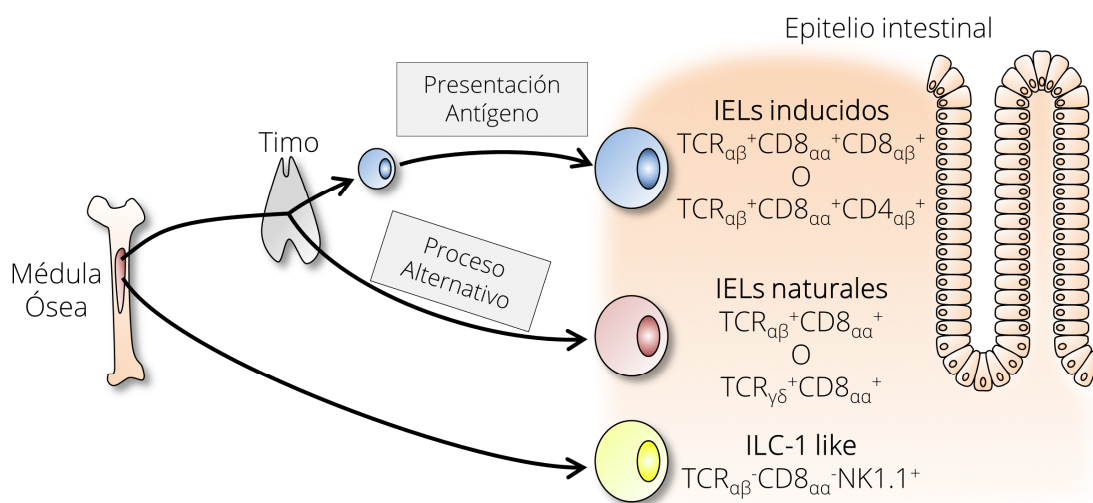


Fig I5: Clasificación de los IELs. Los IELs se clasifican en 3 grupos: IELs inducidos, IELs naturales e ILC-1 like. Los IELs inducidos provienen de linfocitos T convencionales que tras seleccionarse en el timo y una vez que han madurado con la presentación de antígeno, adquieren la expresión de $\text{CD8}_{\alpha\alpha}$ al llegar al colon. Los IELs, naturales a diferencia de los linfocitos convencionales sufren un proceso de selección alternativo en el timo. Por último los ILC-1 like, proviene directamente de sus progenitores en la médula ósea.

Los IELs naturales expresan TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$ y no precisan de la presentación de antígeno para madurar previamente a su llegada al epitelio intestinal (Cheroutre et al., 2011) (Fig I5). Se les atribuye un papel regulatorio de carácter protector (Hu and Edelblum, 2017; Poussier et al., 2002), así como proteger al epitelio frente a microorganismos externos y residentes, la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias, o promover la cicatrización del tejido (Cheroutre et al., 2011; Ismail et al., 2011; Mombaerts et al., 1993; Roberts et al., 1996).

El último grupo de IELs son las células linfoides innatas (ILCs), que no expresan el TCR. Los ILC de tipo 1 (ILC-1 like), que se caracterizan por actuar como las células NK, por la producción de IFN- γ y ejercer un papel patológico en el desarrollo de la colitis (Diefenbach et al., 2014; Fuchs et al., 2013) (Fig I5).

3.1.4. El sistema inmune innato en el colon.

Como hemos nombrado antes, parte de la tercera línea de defensa del epitelio intestinal lo conforman las células del sistema inmune innato entre las que destacan predominantemente los neutrófilos, las células dendríticas y los macrófagos.

Cuando las dos primeras vías de defensa han sido superadas, porque el moco protector ha sido erosionado y se ha producido daño en la barrera epitelial, los monocitos residentes secretan quimioquinas para el reclutamiento de células del sistema inmune. Los primeros en migrar al foco del daño en respuesta a los estímulos son los neutrófilos (Fournier and Parkos, 2012). La principal función de los neutrófilos en el sitio de reclutamiento es acabar con la microbiota infiltrada principalmente a través de la producción de grandes

cantidades de ROS (Campregher et al., 2008; Fournier and Parkos, 2012; Mantovani et al., 2008). Además, poco después de su llegada, los neutrófilos producirán quimioquinas que reclutan a los macrófagos en una segunda ola de respuesta por parte del sistema inmune innato más prolongada en el tiempo (Fournier and Parkos, 2012).

Los macrófagos desempeñan un papel dual en el epitelio intestinal. Por un lado pueden producir citoquinas pro-inflamatorias que mantienen activas a otras células efectoras, o producir quimioquinas que recluten otras células del sistema innato estableciendo un bucle de retroalimentación del proceso inflamatorio (Bain and Mowat, 2014). Por otro lado también participan en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio a través de la fagocitosis de las células epiteliales apoptóticas así como de la microbiota invasora. También estimulan la proliferación de los enterocitos, o promueven la expansión de los IELs CD4⁺ a través de la expresión constitutiva de IL-10 (Bain and Mowat, 2014; Sujino et al., 2016). Los macrófagos se han clasificado clásicamente según su polarización en tipo M1 o tipo M2, correspondiendo cada tipo a un perfil pro-inflamatorio o anti-inflamatorio respectivamente (Mantovani et al., 2004). Sin embargo el perfil de activación de un macrófago no es del todo M1 o M2, sino que se encuentra intermedio entre ambos, más próximo a uno u otro en función de los genes activados (Mantovani et al., 2004; Fernando O. Martinez and Gordon, 2014).

La polarización de tipo M1, pro-inflamatoria, o también conocida como “activación clásica” está relacionada con la coordinación de la respuesta de tipo Th1, la citotoxicidad y los procesos anti-tumorales (Mantovani et al., 2004). La polarización de tipo M2 se conoce también como la “activación alternativa” y por el contrario tiene un carácter más anti-inflamatorio. Puede a su vez

dividirse en 3 grupos: M2a, M2b o de tipo II y M2c o “desactivados”. La polarización de tipo M2a se da para mantener una respuesta de tipo Th2 o de tipo colaborador. La polarización M2b, en respuesta a señales por los receptores de tipo toll (TLR), promueve la inmunoregulación mediante el reclutamiento de linfocito Treg. Por último, la polarización M2c, suprime la respuesta inmune y favorece la remodelación tisular (Mantovani et al., 2004; Fernando O. Martinez and Gordon, 2014).

3.2. Etapas del desarrollo del cáncer en el CAC.

A diferencia del cáncer de colon esporádico, en el CAC, los ciclo sucesivos de desepitelización y reepitelización que se dan en las IBD, suponen un entorno selectivo para las células madre epiteliales en las que se han acumulado mutaciones, las células madre mutantes epiteliales, capaces de sobrevivir al microambiente inflamatorio y de repoblar rápidamente el epitelio dañado (Barker et al., 2007; Humphries and Wright, 2008; Ritsma et al., 2014; Vermeulen and J Snippert, 2014). Con cada ciclo, se verá comprometida la arquitectura de la cripta, regenerada a partir de los clones mutantes que se dividen, generando un proceso displásico de bajo grado (Harpaz and Polydorides, 2010). Esta displasia de bajo grado continuará evolucionando hasta una displasia de alto grado y finalmente en un carcinoma (Choi et al., 2017; Lasry et al., 2016) (Fig I6).

En la actualidad existen diferentes abordajes para el estudio de la progresión del CAC, desde modelos animales que desarrollan CAC de manera espontánea a modelos inducidos mediante el uso de agentes químicos (Kanneganti et al., 2011). Los ratones IL-10 KO son uno de los modelos de generación espontánea, a pesar de que al no verse involucrados ciertos oncogenes

característicos en pacientes de CAC, no es un modelo totalmente óptimo para el estudio de esta patología (Kanneganti et al., 2011). Sin embargo, el modelo químico más estudiado y mejor descrito requiere de la combinación de un potente carcinógeno (Azoximetano (AOM)) con ciclos sucesivos de un irritante químico (sulfato sódico de dextrano (DSS)) (Snider et al., 2016). El modelo de AOM/DSS simula los distintos pasos del desarrollo del CAC en humanos, en que a partir de criptas intestinales normales, empiezan a desarrollarse criptas aberrantes. para formarse finalmente microadenomas (Fig I6). mimetizando a

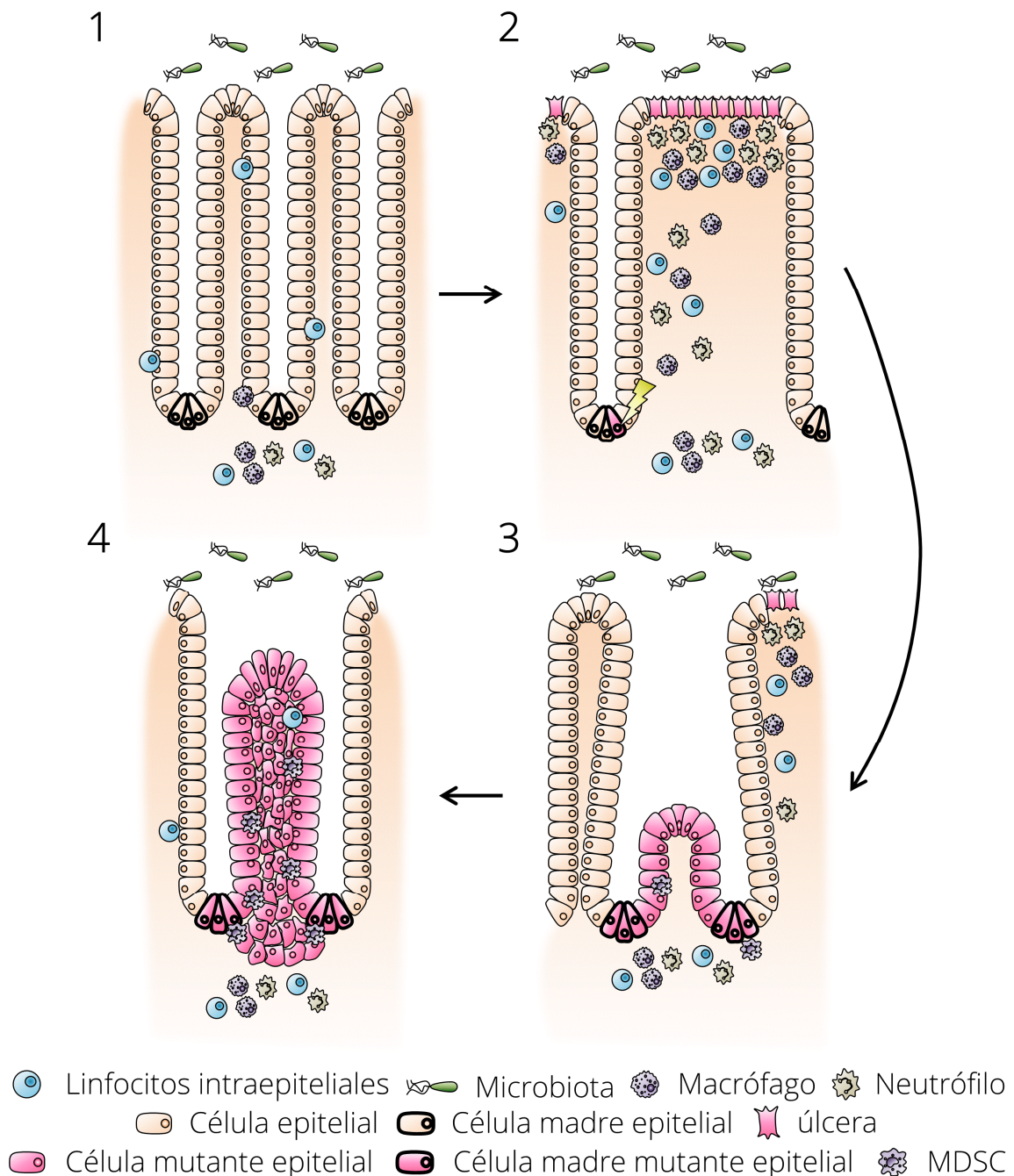


Fig 16: Esquema gráfico del desarrollo tumoral en el CAC. Cuando en el epitelio intestinal (1) se produce un daño, hay una consecuente respuesta inflamatoria que puede crear un microambiente óptimo para la aparición y acumulación de mutaciones en las células madre epiteliales (2). Ciclos sucesivos de inflamación (característicos de las IBD), favorecerán la reepitelización por parte de células mutantes (3) que alteraran de forma aberrante la arquitectura de las criptas hasta la aparición de adenocarcinomas (4).

4. Las p38MAPKs alternativas p38 γ y p38 δ .

4.1. p38MAPKs.

En respuesta a distintos estímulos externos que recibe una célula eucariota, se desatan en ella distintos mecanismos de transducción de señal en cascada desde la membrana celular hacia el interior de la misma. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) se activan en respuesta a distintas señales de estrés, citoquinas o factores de crecimiento (Cuenda and Rousseau, 2007) mediante la fosforilación dual de MAPK quinasas (MAP2K), activadas a su vez por fosforilación a través por MAPK quinasas quinasas (MAP3K). Entre las principales MAPKs se encuentran la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y las p38MAPKs. Esta familia de proteínas se compone de 4 isoformas (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ) codificadas por diferentes genes (Cuenda and Rousseau, 2007).

Mientras la p38 α está altamente expresada de manera ubicua, la expresión de las otras p38MAPKs varía entre los distintos tejidos. Los tejidos donde los niveles de expresión de p38 β son mayores son cerebro, timo y bazo y no se expresa en el músculo esquelético. p38 γ se expresa abundantemente en el músculo esquelético. Por último p38 δ presenta altos niveles de expresión en

las glándulas adrenales, intestino, páncreas, riñones y corazón (Cuadrado and Nebreda, 2010; Escós et al., 2016; Risco and Cuenda, 2012).

Las cuatro p38MAPKs pueden dividirse en dos subgrupos atendiendo a razones de homología de secuencia, especificidad para distintos substratos y la sensibilidad frente a inhibidores químicos (Cuenda and Rousseau, 2007; Kuma et al., 2005; Risco and Cuenda, 2012). Un grupo está formado por p38 α /p38 β y el otro por p38 γ /p38 δ . p38 α es la primera y la mejor caracterizada de las cuatro isoformas, y la diana de los principales inhibidores comerciales. La falta de inhibidores específicos para p38 γ /p38 δ hace imprescindible otros abordajes de investigación, como el trabajo con ratones *knockout* (KO) o condicionales y herramientas de silenciamiento génico (Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017; Escós et al., 2016).

4.2. p38 γ y p38 δ , inflamación y cáncer.

p38 γ y p38 δ participan en la regulación de la inflamación a distintos niveles y su papel no se restringe únicamente a la producción de citoquinas. Ambas p38MAPKs son necesarias para el correcto reclutamiento de neutrófilos en los modelos de ratón para colitis, inflamación de la piel o hígado graso (Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017). Además también participan en el desarrollo, activación y proliferación de los linfocitos T (Criado et al., 2013; Risco et al., 2018).

Estudios previos realizados en el grupo han demostrado que la estimulación de macrófagos deficientes en ambas p38 γ y p38 δ MAPKs con LPS, produce menor cantidad de TNF α , IL-1 β e IL-10 y mayor cantidad de IL-12 e IFN β respecto a la producción en macrófagos WT en las mismas condiciones (Risco

et al., 2012). Esto es debido a que p38 γ y p38 δ regulan a nivel proteico a TPL2 y ABIN-2, las cuales se encuentran por encima de la vía de transducción de señal de ERK1/2 (Risco et al., 2012). La intervención de p38 γ y p38 δ en la producción de citoquinas no se limita únicamente a un tipo celular. Estudios realizados por el grupo concluyeron por un lado que son necesaria para la producción de IL-6, IL-1 β y CXCL1 en queratinocitos (Zur et al., 2015), y por otro lado para la producción de IFN γ e IL-17 en células T (Criado et al., 2013).

La función que desempeñan en un proceso cancerígeno depende del contexto celular en el que se encuentren, ejerciendo un efecto pro-tumoral o anti-tumoral en distintos tejidos, lo cual se ha descrito en diversos estudios usando muestras de pacientes o líneas celulares cancerígenas humanas (Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017). En cuanto al potencial anti-tumoral de p38 γ y p38 δ , en estudios previos del grupo se observó que la deficiencia de estas p38MAPKs en fibroblastos embrionarios de ratón supone un incremento en la migración celular así como en la expresión de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9). Por otro lado, en ensayos *in vitro*, la delección de p38 δ supone el bloqueo de la señal de inhibición por contacto, y la delección de p38 γ en fibroblastos donde se sobreexpresa K-Ras promueve la proliferación celular y la tumorigénesis (Cerezo-Guisado et al., 2011). Otros modelos de cáncer asociado a inflamación que se han estudiado en el grupo son la carcinogénesis de piel inducida por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) y el CAC inducido por AOM/DSS, y en ambos casos p38 γ y p38 δ muestran potencial pro-tumoral. En el primer modelo se observó que ratones deficientes en p38 γ y p38 δ muestran menor número de tumores, menor proliferación, menor inflamación, menor reclutamiento de neutrófilos y la inhibición de la producción de citoquinas y quimioquinas en la piel (Zur et al., 2015). En el modelo de CAC se demostró que la tumorigénesis era menor en ratones

deficientes en p38 γ o p38 δ , lo que se correlacionaba con menor inflamación, menor producción de citoquinas y quimioquinas, menor reclutamiento de las células del sistema inmune, y que este efecto aún era más pronunciado en los ratones deficientes para ambas p38MAPKs (Del Reino et al., 2014). También se describió que la incidencia tumoral en ratones WT con la médula ósea reconstituida a partir de ratones deficientes en p38 γ/δ era menor que la de ratones deficientes en p38 γ/δ reconstituidos con médula ósea de ratones WT (Del Reino et al., 2014). Este resultado, junto con otro estudio en que se observó que la deficiencia de p38 γ en las IEC reduce la tumorigénesis (Yin et al., 2015), corrobora que el papel de p38 γ y p38 δ dependen del contexto celular en que se encuentren.

Todos estos estudios subrayan la importancia de las p38MAPKs p38 γ y p38 δ en una patología de tanto impacto global como es el cáncer. Aun así queda mucho por esclarecer en cuanto al papel que desempeñan ambas, tanto individualmente como en conjunto, en las distintas etapas del proceso tumoral, y en los distintos tejidos celulares implicados.

Objetivos

Objetivos.

El objetivo principal de esta tesis doctoral es analizar el papel de p38 γ y p38 δ en dos compartimentos celulares, como son el epitelio intestinal y las células de la línea mieloide, en la iniciación y el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis.

Para poder alcanzar este objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

1. Generar una nueva línea de ratón que específicamente no exprese p38 γ y p38 δ en las células del epitelio intestinal.
2. Estudiar la función de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal y en la línea mieloide en el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis mediante el análisis de procesos implicados en el desarrollo tumoral (proliferación y apoptosis), el reclutamiento de células del sistema inmune innato y adaptativo al tumor y la inducción de la expresión de proteínas implicadas en los procesos inflamatorios.
3. Estudiar el papel de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal y en la línea mieloide en el modelo de colitis, mediante el análisis del daño epitelial y su regeneración, el reclutamiento de células del sistema inmune innato y adaptativo al epitelio dañado, y la inducción de la expresión de proteínas implicadas en los procesos inflamatorios.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos:

1. Tampones.

1.1. Tampones.

- Tampón de lisis para las colas: 100mM TRIS/HCl pH 8.5, 5mM EDTA pH 8, 0,2% SDS (p/V), 200mM NaCl y 0,2 mg/ml proteinasa K.
- Tampón de lisis: 50mM Tris/HCl pH 7.5, 1% Tritón-X-100 (V/V), 1mM EDTA pH 8, 1mM EGTA pH8, 50mM NaF, 10mM β -glicerofosfato de sodio, 5mM pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), 270mM sacarosa. Los siguientes reactivos se añaden en el momento de uso: 1 mM ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), 1mM Benzamidina, 0,1mM PMSF, 0,1% β -mercaptoetanol (V/V).

Para despolimerizar el vanadato y mejorar la capacidad del Ortovanadato de Sodio en la inhibición de las tirosin fosfatasas, el compuesto necesita disolverse en agua, varios ciclos de hervir y dejar enfriar a temperatura ambiente y ajustar a pH 10. Se repite alrededor de cinco ciclos hasta que la solución queda incolora y a un pH constante de 10.

- Tampón de carga de electroforesis: 50mM Tris/HCl pH 6,8, 6% glicerol (V/V), 2% SDS (p/V), 0,004% azul de Bromofenol. Añadir 1% β -mercaptoetanol (V/V) en el momento de uso.
- Tampón de electroforesis: 192mM glicina, 25mM Tris/HCl pH 8.3, 0,1% SDS (p/V).
- Tampón de transferencia: 39mM glicina, 48mM Tris/HCl pH 8.3, 0,04% SDS (p/V). Añadir 20% metanol (V/V) en el momento de uso.
- Tampón TBS/TBS-T: 10mM Tris/HCl 7.4, 150mM NaCl. El TBS-T contiene además 0,05% tween20 (V/V).

- Tampón PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₃PO₄, 1,4 mM KH₂PO₄.
- Tampón citrato: 10mM citrato de sodio (C₆H₅Na₃O₇). Ajustar a pH 6.
- Tampón TdT: 25mM Tris/HCl pH 8,8, 0,025% BSA (p/V), 25mM cacodilato de sodio ((CH₃)₂AsO₂Na·2H₂O).

2. Tratamientos realizados en ratones.

2.1. Ratones.

Para esta tesis hemos generado los ratones transgénicos VillinCre-p38y/δ^{-/-} que no expresan ni p38y ni p38δ en las células del epitelio intestinal. Para ello hemos cruzado la línea p38y/δ^{flox/flox} con la cepa Villin-Cre de Jackson Laboratory (ref. 004586). También hemos empleado los ratones LyCre-p38y/δ^{-/-} (Zur et al., 2015). Como controles para los experimentos realizados con estos knockout (KO) condicionales (VillinCre-p38y/δ^{-/-} y LysCre-p38y/δ^{-/-}) hemos usado ratones silvestres (WT), ratones p38y/δ^{flox/flox} o p38y/δ^{-/-} (Sabio et al., 2005). Los ratones p38y/δ^{-/-} fueron empleados como controles del efecto global de la delección en todo el organismo, mientras que los ratones p38y/δ^{flox/flox} junto con los WT para corroborar que las posibles diferencias encontradas en los experimentos se debían a la delección de p38y/δ. Los ratones utilizados en esta tesis tienen un fondo C57BL/6, y no presentan ninguna aparente alteración fenotípica en las condiciones basales libres de patógenos existentes en el animalario del CNB. Las colonias se mantuvieron libres de patógenos en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), y el manejo de los ratones se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos por la Unión Europea, bajo el protocolo PROEX 316/15, revisados y aprobados por el comité ético del CNB del CSIC y de la Comunidad autónoma de Madrid.

Para el genotipado de los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ se extrajo el DNA de un trozo de 3-5mm cortado de la cola de los ratones. El tejido se lisó con 500 μ l del tampón de lisis para las colas durante 3 horas a 56°C y 1.400 rpm en thermomixer compact (Eppendorf). Para separar el DNA se centrifugaron las muestras 5 min a 4°C y 12.000 rpm en una centrífuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen), y se descartó el precipitado. Posteriormente se precipitó el DNA añadiendo al sobrenadante 500 μ l de isopropanol, y centrifugando 5 min a 4°C y 12.000 rpm en una centrífuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen). El pellet se lavó con 500 μ l de Etanol 70% (V/V) centrifugando 5 min a 4°C y 12.000 rpm en una centrífuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen). Después se resuspendió en 100-200 μ l de H₂O destilada. La PCR se llevó a cabo con 1-2 μ l de la disolución más la *master mix* (5Prime MasterMix). Para la amplificación de las secuencias genómicas mediante PCR se usaron los siguientes Oligos: Forward 5'-CCATGAGTGAACGAACCTGGTCG-3', Reverse 5'-TGCCTGCATTACCGGTGCGATGC-3'. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Bio-rad) con el siguiente programa: 94°C 3 min; 35 ciclos de 94°C 30 s, 56°C 30s y 72°C 1 min; 72°C 10 min, y el resultado de la PCR se resolvió en un gel de agarosa (Conda) al 1%.

2.2. Modelo de inducción de CAC en ratones.

La inducción de tumores en el colon se realizó siguiendo un protocolo muy establecido para este tipo de cáncer, mediante la administración de azoximetano (AOM) y sulfato sódico de dextrano (DSS). En los experimentos usamos ratones machos y hembras de entre 10 y 14 semanas de edad. El día 1 de tratamiento se les administró, mediante inyección intraperitoneal, 10mg/Kg de peso de AOM (Sigma-Aldrich, 1001092684) disuelto en PBS. Tras 6

días se iniciaron los ciclos de tratamiento con DSS 2% (p/V) (Dextran sulfate sodium salt colitis grade 36,000-50,000 MW, MP Biomedicals, 160110), disuelto en el agua de los bebederos, durante 5 días, seguidos de 16 días de recuperación con agua sin DSS. El tratamiento completo constó de 3 ciclos completos de DSS 2% (p/V), tras los cuales los ratones se mantuvieron con agua normal hasta los 60 u 80 días desde que se les inyectó el AOM, en función de los análisis que se quisieran realizar. Establecido el momento de sacrificarlos y tras eutanasia por CO₂, se extrajo el colon de los ratones, se limpiaron, se contaron y midieron el número y el tamaño de los tumores, y se procesaron en función del ensayo que se fuera a llevar a cabo.

- a. Para la valoración de los niveles de mRNA de distintos genes mediante qPCR, se tomaron muestras a día 60 del colon entero.
- b. Para la valoración del grado de proliferación y de apoptosis mediante microscopía de fluorescencia se tomaron muestras a día 60 y día 80 del colon entero. En ambos casos se cuantificaron el número de células positivas para BrdU o positivas para TUNEL por mm² en al menos 20 campos.
- c. Para la visualización y valoración estructural de los tumores mediante microscopía óptica, se tomaron muestras a día 60 y 80 del colon entero.
- d. Para la valoración de los niveles de reclutamiento de células del sistema inmune en los tumores se tomaron muestras a día 80 de los tumores generados.

2.3. Modelo de colitis en ratones.

En esta tesis hemos utilizado el modelo de colitis inducido por DSS en ratones machos y hembras de entre 10 y 14 semanas. Para ello, los ratones se tratan

con 3% DSS (p/V) (Dextran sulfate sodium salt colitis grade 36,000-50,000 MW, MP Biomedicals, 160110) disuelto en el agua de los biberones durante 5 días. Pasados los 5 días de inducción se sustituyeron los biberones con DSS por unos con agua normal y se sacrificaron los ratones con CO₂ y se extrajo el colon o la sangre a distintos tiempos en función de los análisis que se quisieran realizar.

- a. Para la valoración de los niveles de mRNA de distintos genes mediante qPCR se tomaron muestras a día 0 y día 6 (5 días de tratamiento con DSS 3% (p/V) y un día de recuperación con agua).
- b. Para la valoración del grado de proliferación en las criptas mediante microscopía de fluorescencia se tomaron muestras a día 0, a día 5 (al final del ciclo de DSS 3% (p/V)) y día 10 (5 días de recuperación después del ciclo de DSS 3% (p/V)). Se contabilizó el número de células BrdU positivas frente al número de células por criptas en al menos 20 criptas por ratón.
- c. Para la valoración del grado de apoptosis mediante microscopía de fluorescencia se tomaron muestras a día 0, día 2,5 (a mitad del ciclo de DSS 3% (p/V)), a día 5 (al final del ciclo de DSS 3% (p/V)) y día 10 (5 días de recuperación después del ciclo de DSS 3%(p/V)). Se contabilizaron las células positivas para TUNEL en al menos 20 campos por ratón.
- d. Para la valoración de los niveles de infiltración leucocitaria mediante citometría de flujo se tomaron muestras a día 0 y día 5 (al final del ciclo de DSS 3% (p/V)).
- e. Para la valoración histopatológica se tomaron muestras a día 0, a día 5 (al final del ciclo de DSS 3% (p/V)), a día 10 (5 días de recuperación después del ciclo de DSS 3% (p/V)) y a día 15 (10 días de recuperación después del ciclo de DSS 3% (p/V)).

f. Para la valoración de la permeabilidad del epitelio intestinal se tomaron muestras de sangre a día 0, día 2,5 (a mitad del ciclo de DSS 3% (p/V)), a día 5 (al final del ciclo de DSS 3% (p/V)).

g. Para la medida de distintas citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento mediante el kit *Mouse XL citokine Array* se tomaron muestras del colon entero a día 6 (5 días de tratamiento con DSS 3% (p/V) y un día de recuperación con agua).

2.4. Irradiación de los ratones.

Para corroborar los resultados que obtuvimos acerca de la permeabilidad intestinal en respuesta al daño por DSS, generamos daño en el epitelio intestinal mediante radiación. Para ello los ratones se anestesiaron inyectándoles intraperitonealmente (10 µl / g de peso) una dilución de Ketamina (5 mg / ml) y Xilacina (2 mg / ml) en PBS. Una vez dormidos los ratones se les protegió la caja torácica mediante una camisa de plomo y se les administro una radiación de 14 Gy. Los ratones se mantuvieron calientes con una manta eléctrica y con los ojos hidratados añadiéndoles gotas de PBS. Una vez irradiados, los ratones se recuperaron y a las 72 horas de la irradiación, se extrajo sangre para determinar la permeabilidad a partir del suero, como se describe en el apartado 3.9. de esta sección.

2.5. Obtención de macrófagos peritoneales.

Para incrementar el reclutamiento de macrófagos en la cavidad peritoneal, se inyectaron los ratones con 2 ml de tioglicolato 3% (p/v) intraperitonealmente. A los 3 días de la inyección se sacrificaron con CO₂. Una vez sacrificados se abrió la cavidad peritoneal sin dañar el peritoneo y se realizó un lavado con 5 ml de

PBS estéril. El volumen recogido tras el lavado se centrifugó 5 min a 4°C y 1.200 RPM en una centrifuga refrigerada (Heraeus Megafuge 2.0R). El pellet se sembró en placas p100 mm no tratadas a una densidad de 7×10^6 células / placas en 10 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS (V/V), 2mM glutamina, 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. Después de 5 horas los macrófagos se han adherido por lo que absorbemos el sobrenadante con el resto de células no adheridas y lavamos las placas con PBS frío. A las 24 horas se lisaron los macrófagos de las placas de cultivo con 500 µl de tampón de lisis con la ayuda de una rasqueta para células. A continuación los lisados se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 13.000 RPM en una centrifuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen). Posteriormente se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante mediante la técnica de Bradford con *reactivo coomasie Plus Protein* (Thermo Scientific) en un espectrofotómetro *multiskan go* (Thermo Scientific).

3. Métodos experimentales.

3.1. Medida del número y volumen de los tumores generados con el tratamiento de AOM/DSS.

Como se ha indicado previamente en el apartado 2.2., tras la inyección intraperitoneal de AOM y los 3 ciclos de DSS, se inducen tumores en el colon de los ratones. A los 60 y 80 días del tratamiento, en función del experimento, los ratones fueron sacrificados, se les extrajo el colon, el colon se abrió longitudinalmente y se limpió de heces pasándolo por PBS. Una vez que los distintos colones estaban abiertos y limpios, se extendieron sobre una superficie limpia y plana, se contabilizó el número de tumores reconocibles macroscópicamente, y se tomaron medidas de la longitud y anchura de cada

tumor, en las direcciones marcadas por los ejes imaginarios X y Z, con la ayuda de un calibre de precisión. El volumen de los tumores se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen (mm}^3\text{)} = 0,4 \times \text{longitud} \times \text{anchura}^2$$

3.2. Preparación de muestras proteicas.

Para estudiar los niveles de expresión de distintas proteínas, se obtuvieron muestras biológicas de ratones. Las muestras biológicas se pulverizaron con un mortero de laboratorio, manteniéndolas congeladas durante todo el proceso con nitrógeno líquido. Al pulverizado se le añadieron dos volúmenes de tampón de lisis, se homogeneizó por agitación y se dejó 10 minutos a 4°C. A continuación las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 13.000 RPM en una centrifuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen). Posteriormente se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante mediante la técnica de Bradford con *reactivo coomasie Plus Protein* (Thermo Scientific) en un espectrofotómetro *multiskan go* (Thermo Scientific).

3.3. Inmunodetección (Western-blot).

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a diferentes porcentajes en función de las proteínas que queríamos separar, entre el 10 y el 12%. Las muestras proteicas se desnaturalizaron en tampón de carga durante 5 minutos a 90°C y se corrieron en los geles de poliacrilamida con tampón de electroforesis a 120V durante 2 horas. Posteriormente las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa en un aparato de transferencia semi-seca *Trans-Blot Turbo Blotting System* (Bio-Rad) durante 25 minutos a 25V. Después,

las membranas se bloquearon con leche 10% (p/V) en TBS-T durante 30 minutos en un balancín a agitación lenta y temperatura ambiente. Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés (Tabla A) diluido en leche 5% (p/V) en TBS-T durante toda la noche a 4°C o durante 2 horas a temperatura ambiente, en ambos casos con agitación. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 minutos antes de incubarlo con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente (Tabla A) durante 1 hora en agitación y temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron mediante *Odyssey infrared imaging system* (LI-COR Bioscience).

Tabla A. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por Western-blot.

Anticuerpos primarios							
Anticuerpo				Casa comercial	Referencia	Dilución	IgG
p38α				Santa Cruz	SC-535	1/1000	Conejo
p38γ				DSTT*	--	1µg/ml	Oveja
p38δ				DSTT*	--	1µg/ml	Oveja
E-cadherina				BD Transduction laboratory	610181	1/1000	Ratón
Anticuerpos secundarios para detección por Western-blot							
Alexa Sheep	Fluor	680	Anti- Molecular Probes		A-21102	1/5000	Burro
Alexa Rabbit	Fluor	680	Anti- Molecular Probes		A-21109	1/5000	Cabra
Alexa Mouse	Fluor	700	Anti- Molecular Probes		A-21036	1/5000	Cabra

*DSTT: Aportados por Division of Signal Transduction Therapy (Dundee, UK).

3.4. Extracción de RNA.

Para determinar los niveles de mRNA de distintos genes en el colon de los ratones, se obtuvieron muestras a las condiciones indicadas en los apartados 2.2.a. y 2.3.a. Las muestras se pulverizaron con el mortero (de manera idéntica a como se describe en el apartado 3.2. de esta sección). A los pulverizados se les añadió 1ml de NZYol (Nzytech), se homogeneizaron mediante agitación con vortex y se dejaron 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200µl de Cloroformo a cada muestra, se agitaron de nuevo y se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 RPM 4°C en una centrifuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen). Se recogió la fase acuosa situada en la parte superior y sobre esta se añadieron 500 µl de isopropanol, se realizaron 10 volteos y se dejó a -20°C durante 20 minutos. A continuación se volvió a centrifugar 15 minutos a 13.000 RPM 4°C en una centrifuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen) y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó 3 veces con 200µl de Etanol 70% (V/V) centrifugando 5 minutos a 13.000 RPM 4°C en una centrifuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen). Finalmente el RNA se resuspendió en 100µl de H₂O libre de RNAsas y se almacenó a -80°C. La cuantificación de la concentración de RNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (Thermoscientific).

3.5. RT-PCR Cuantitativa (qRT-PCR).

Una vez obtenido el RNA de las muestras biológicas como se ha indicado, se transcribió a cDNA. Para ello se partió de 500ng de RNA por muestra y se realizó una PCR con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). El cDNA producto de la PCR se diluyó 1/20 y se almacenó a -80°C. La qRT-PCR se

realizó por triplicado con 2.5 µl de la dilución de cDNA y 5.5 µl de *master mix*. La *master mix* contiene la mezcla de los oligonucleótidos específicos (Tabla B) (20µM por oligonucleótido y por punto), *HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne) (1,6 µl por punto), y agua destilada libre de RNAsas hasta alcanzar los 5,5µl. La reacción se llevó a cabo en un *ABI PRISM 7900HT* (*Applied Biosystems*). El análisis de los resultados se hizo mediante el software *ABI PRISM SDS v2.2* y se cuantificaron los ciclos de amplificación usando el método comparativo de los CT (*cycle threshold*). Las muestras fueron primeramente normalizadas frente a GAPDH como control interno y a continuación se relativizaron a la condición de control.

Tabla B. Oligos para las reacciones de qRT-PCR.

Gen	Oligo 5'→3'	Oligo 3'→5'
ALP	AACCCAGACACAAGCATTCC	GAGACATTTTCCCGTTCACC
Bcl2	CACCTGACGCCCTTCACC	GTCCTTCAGAGACAGCCAGGAG
BclXL	GACAAGGAGATGCAGGTATTGG	TCCCGTAGAGATCCACAAAAGT
CCL2	TTGGGATCATCTTGCTGGTG	TCTGGGCCTGCTGTTACA
CCL3	TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT	GTGGAATCTCCGGCTGTAG
CCL5	ATATGGCTCGGACCACTC	TTCTCGAGTGACAAACACG
CCL9	CAAAGGAGGGCATTATGAGC	CCTTGCTGTGCCTTCAGACT
CCL25	CCAAGGTGCCTTTGAAGACT	TCCTCCAGCTGGTGGTTACT
CCND1	TTGTGCATCTACACTGACAACCTC	AGGGTGGGTGGAAATGAACCT
ChgA	CTGACCGCTCCATGAAGCTCT	CCTACTCGAGCAGCAGTCT
c-Myc	GGAAACCCCGCAGACAGCCACGACGATGCC	ACATAGGATGGAGAGCAGAGCCCGGAGCG
COX2 (PSTG2)	ATCCTGCCAGCTCCACCG	TGGTCAAATCCTGTGCTCATACAT
CXCL1 (KC)	CCTTGACCCTGAAGCTCCCT	CGGTGCCATCAGAGCAGTCT
CXCL10	GGATCCCTCTCGCAAGGA	ATCGTGGCAATGATCTCAACA
CXCL2 (MIP-2)	CCTGGTTCAGAAAATCATCCA	CTTCCGTTGAGGGACAGC
GAPDH	CCCATCACCATCTTCCAGGA	CGACATACTCAGCACCGGC
HIF1α	ACCTTCATCGGAACTCCAAAG	CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG
IFNβ	TCAGAATGAGTGGTGGTTGC	GACCTTCAAATGCAGTAGATTCA
IFNγ	GCAACAGCAAGGCGAAAAAG	ATCTCTTCCCCACCCGAAT

IGFBP-1	GATCGCCGACCTCAAGAA	TGGGCTGCAGCTAATCTCTC
IGFBP-2	AGGGTGCCAAACACCTCA	GGAGATCCGCTCCAGGAC
IGFBP-3	GTCTTTTGTGCAAAATAAGGCATA	GTCTTTTGTGCAAAATAAGGCATA
IL10	CAGGACTTTAAGGGTTACTTG	ATTTTCACAGGGGAGAAATC
IL11	AGGGGCAACGACTCTATCTG	CTGTGGGGACATGAACTGTG
IL13	TGAGGAGCTGAGCAACATCACACA	TGCGGTTACAGAGGCCATGCAATA
IL17A	ACGTTTTCTCAGCAAACCTTAC	CCCCTTTACACCTTCTTTTC
IL17F	CCCATGGGATTACAACATCACTC	CACTGGGCCTCAGCGATC
IL18	ACTGGCTGTGACCCTCTCTG	TGGATCCATTTCTCAAAGG
IL1 β	TGGTGTGTGACGTTCCCAT	CAGCACGAGGCTTTTTTGTG
IL6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTACATA
iNOS	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
Ki67	GATTCCATTAACAAGAGTG	CTCTTTTCAGTGGTGTATTA
MUC2	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	GATGAGGTGGCAGACAGAGAC
Ocludina	TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA	CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG
Osteopontina/SPP1	GAGGAAACCAGCCAAGGAC	TGCCAGAATCAGTCACCTTCA
Pentraxina 2/SAP	TCCAAGAAGAGCACAATGGA	AAATGCCTTTCCCTTCATGTC
Pentraxina 3/STG	CGCTGTGCTGGAGGAACT	GGGAAGAAAATTGCTGTTTCAC
S100A8	GGAATCACCATGCCCTCTA	TGGCTGTCTTTGTGAGATGC
S100A9	TCATCGACACCTTCCATCAA	GTCCTGGTTTGTCCAGGT
TGF β	GGAACTCTACCAGAAATATAGCAACAATTC	GGAACTCTACCAGAAATATAGCAACAATTC
TNF α	CTGTAGCCACGTCGTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG
ZO-1 (TJP1)	GCCGCTAAGAGCACAGCAA	GCCCTCCTTTTAACACATCATCAGA

3.6. Procesamiento histológico de las muestras de colon.

Se extrajo el colon de los ratones sin tratar, para el estudio en condiciones basales y como muestras control, y ratones tratados con DSS o AOM/DSS a las condiciones indicadas en los apartados 2.2. y 2.3.. Se abrió longitudinalmente y se limpió de heces pasándolo por PBS antes de enrollarlos en una espiral concéntrica con la zona distal situada en el centro de la espiral. Una vez enrollado se fijaron en solución de formalina 10% tampón neutral (HT501128-4L, Sigma-Aldrich) durante 24 horas a temperatura ambiente. La inclusión de las

muestras de colon en bloques de parafina y el corte de los mismos en secciones de 5µm de grosor fue realizada por el servicio de histología del CNB o por el Doctor José Montans Araujo del Centro Anatomopatológico, S.L.

3.6.1. Técnica de Schiff.

La Técnica de Schiff es una reacción colorimétrica en la que se usa ácido peryódico de Schiff (PAS) para la detección de las células caliciformes en el epitelio intestinal, debido a que vira desde incoloro a fucsia al contacto con grupos aldehídos. Las secciones de colon de ratones control sin tratar obtenidas en el apartado 3.6 fueron teñidas con PAS por el servicio de histología del CNB. Se cuantificó el número de células positivas para PAS de al menos 30 criptas por cada ratón de los diferentes genotipos utilizando un microscopio de campo claro Eclipse E600 (Nikon) con cámara incorporada (Leica).

3.6.2. Tinción hematoxilina-eosina.

La tinción con hematoxilina-eosina (H&E) se usa para el análisis histopatológico. La tinción se basa en que la hematoxilina colorea las estructuras ácidas (como los núcleos celulares) de tonos azulados o purpúreos mientras que la eosina colorea los componentes básicos (como el citoplasma) de tonos rosáceos. Las secciones de colon de ratones sin tratar, y de ratones tratados con DSS o AOM/DSS a las condiciones indicadas en los apartados 2.2.c. y 2.3.e., obtenidas como se indica en el apartado 3.6., fueron teñidas con H&E por el servicio de histología del CNB. Para medir la longitud de las criptas se tomaron fotos utilizando un microscopio de campo claro Eclipse E600 (Nikon) con cámara incorporada (Leica) y se midieron al menos 80 criptas por ratón, desde la parte basal a la apical, con el software *ImageJ2*.

3.6.3. Inmunofluorescencia.

Las secciones histológicas preparadas como en el apartado 3.6. se desparafinaron y rehidrataron mediante una serie de pases sucesivos por xilol (3x5 minutos), etanol absoluto (2x5 minutos), etanol 95% (V/V) (2x5 minutos), etanol 70% (V/V) (2x5 minutos), etanol 50% (V/V) (2x5 minutos), H₂O destilada (5 minutos) y finalmente PBS (5 minutos). La recuperación de los epítomos se llevó a cabo mediante incubación con tampón citrato calentando durante 15 minutos a 800-950W en horno microondas. Tras dejar enfriar los portas, se pintó el contorno de los distintos cortes histológicos con el lápiz hidrofóbico (*mini pap pen liquid bloquer*, TED PELLA INC.) y las secciones se bloquearon con suero de cabra 3% (V/V) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad. Una vez bloqueadas, las secciones se incubaron con el anticuerpo de interés (Tabla C) diluido en suero de cabra 3% (V/V) en PBS durante toda la noche a 4°C o en las condiciones recomendadas por la casa comercial, en ambos casos en cámara húmeda y oscuridad. Tras la incubación del anticuerpo primario se pasó 3 veces por PBS y se lavó con PBS durante 5 minutos antes de incubar con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente (Tabla C) en suero de cabra 3% (V/V) en PBS. A continuación, se pasaron de nuevo 3 veces por PBS y el exceso de anticuerpo se lavó con PBS durante 5 min antes de realizar la tinción de núcleo con Hoechst 33342 (Tabla C) en suero de cabra 3% (V/V) en PBS durante 10 minutos en oscuridad. El exceso de Hoechst 33342 se eliminó pasando 3 veces por PBS y después se lavó 5 minutos con PBS para posteriormente acabar montando los portas usando la solución de montaje *VectaMount médium* (Vector Laboratories) y cubreobjetos. Las imágenes se tomaron en un microscopio de fluorescencia *Leica DMI6000B* y se analizaron con el software *ImajeJ2*.

Tabla C. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por Western-blot.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución	IgG
BrdU [BU1/75(ICR1)]	Abcam	ab6326	1/100	Rata
E-cadherina	BD Transduction Laboratories	610181	1/100	Ratón
Claudina-1	Santa Cruz	sc-166338	1/100	Ratón
Anticuerpos secundarios para la detección por Inmunofluorescencia				
Alexa fluor 647 Anti-Rat	Molecular Probes	A-21247	1/200	Cabra
Anti-Mouse IgG Cy5	Jackson	115-176-071	1/400	Cabra
Reactivos para la detección por Inmunofluorescencia				
Estreptavidina Cy5	Jackson	016-170-084	1/1250	--
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	H6024	1/10000	--

3.6.4. Ensayo de proliferación celular.

Usamos la incorporación del 5-bromo-2'-desoxiruridina (BrdU, Roche 10280879001) para determinar mediante inmunofluorescencia los niveles de proliferación a nivel basal, en las criptas del epitelio intestinal tras el tratamiento con DSS como se indica en el apartado 2.3.b. y en los tumores procesados a día 60 u 80 de tratamiento con AOM/DSS como se indica en el apartado 2.2.b. El BrdU es un nucleótido sintético análogo a la timidina que se incorpora en el DNA de *ново* de la células replicativas durante la fase S del ciclo celular. Los ratones se inyectaron intraperitonealmente con BrdU (10mg/kg de peso) en PBS dos horas antes de ser sacrificados. El BrdU intercalado en el DNA se detectó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo específico de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.6.3. Para evaluar los niveles de proliferación en criptas se contabilizó el porcentaje de células BrdU positivas por cripta de al menos 20 criptas en la secciones de

ratones control o los ratones tratados con DSS, mientras que para evaluar los niveles de proliferación en tumores se contabilizó el número de células positivas por mm² de al menos 20 campos.

3.6.5. Detección de células apoptóticas por la técnica de TUNEL.

La técnica denominada de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) se basa en la detección de la rotura del DNA internucleosomal típico de los procesos apoptóticos. Las secciones histológicas preparadas como se indica en el apartado 3.6. de los ratones sin tratar o tratados con DSS o con AOM/DSS, se desparafinaron y rehidrataron como se ha descrito en el apartado 3.6.3. Posteriormente el tejido se permeabilizó con Triton X-100 0.5% (V/V) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la permeabilización se pasó 3 veces por PBS y se lavó con PBS durante 5 minutos antes de pintar el contorno de los distintos cortes histológicos con el lápiz hidrofóbico (*mini pap pen liquid bloquer*, TED PELLA INC.). Las distintas secciones se preincubaron con tampón TdT en PBS complementado con CoCl₂ 1mM durante 15 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda y oscura. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora en la cámara húmeda y oscura a 37°C añadiendo 3% enzima *TdT* (V/V) y 2% *biotin-16-dUTP* (V/V). Completada la reacción las secciones se pasaron por PBS 0.01% Tween 20 3 veces, se lavó con PBS 0.01% Tween 20 5 minutos para parar la reacción, y se incubó con estreptavidina conjugada a Cy5 (Tabla C) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscura. El exceso de estreptavidina se eliminó pasando 3 veces por PBS y lavando con PBS 5 minutos antes de teñir el núcleo con Hoechst 33342 durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura. El exceso de Hoechst 33342 se

eliminó pasando 3 veces por PBS y después se lavó 5 minutos con PBS para posteriormente acabar montando los portas usando la solución de montaje *VectaMount médium* (Vector Laboratories) y cubreobjetos. Para evaluar los niveles de apoptosis se contabilizó el número de células TUNEL positivas en al menos 20 campos. Para evaluar los niveles de apoptosis en tumores se contabilizó el número de células TUNEL positivas por mm² en al menos 20 campos. Se tomaron las imágenes en un microscopio de fluorescencia *Leica DMI6000B* y se analizaron con el software *ImajeJ2*.

3.6.6. Microscopía electrónica.

Una de las técnicas empleadas para valorar la estructura basal del epitelio intestinal fue la microscopía electrónica. Mediante el uso de un microscopio electrónico se tomaron imágenes y se valoró la integridad de las estructuras intercelulares a partir de los siguientes parámetros: el número de puntos de unión (Kissing points), la longitud de las uniones estrechas (Tight junctions; TJ), la anchura de las TJ, la distancia entre el final de las TJ y el primer desmosoma (DS), la longitud de los DS y la anchura de los DS. Para ello se extrajo el colon de los ratones, se abrió longitudinalmente y se limpió de heces pasándolo por PBS. Una vez lavado el colon, se colocó sobre una placa de Petri con cera dental y bien cubierto con fijador (Paraformaldehído 4%, glutaraldehído 2%, en PBS). Se cortaron secciones de aproximadamente 1mm² con una cuchilla procurando que el tejido no se desgarrara. Una vez cortados se introdujeron en un tubo falcon con 3ml de fijador. Las secciones se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se renovó el fijador y se mantuvo a 4°C hasta el día siguiente. El resto del procesamiento fue llevado a cabo por el servicio de microscopía electrónica del CNB. Las imágenes se tomaron en un microscopio *JEOL JEM 1011* con una cámara *Gatan ES1000Ww*.

Los parámetros indicados anteriormente se midieron mediante el software *ImageJ*2.

3.6.7. Análisis histopatológico.

El análisis histopatológico del colon de ratones control y de ratones tratados con DSS en las condiciones indicadas en el apartado 2.3.e., fue realizado por el Doctor José Montans Araujo. Se llevó a cabo en secciones teñidas con hematoxilina y eosina como se indica en el apartado 3.6.2. La inflamación se valoró con una puntuación del 1 al 4 con el siguiente criterio: 1, bajos niveles de inflamación con leves punteados de células mononucleares infiltradas; 2, moderada inflamación con múltiples focos; 3, altos niveles de inflamación con aumento de la densidad vascular y marcado engrosamiento de la pared; y 4, máxima severidad de inflamación con infiltración de leucocitos transmural y pérdida de células calciformes. La ulceración se valoró con una puntuación del 1 al 4 con el siguiente criterio: 0, sin úlceras; 1, ligeras lesiones; 2, 1 o 2 úlceras; 3, de 3 a 4 úlceras; 4, más de 4 úlceras o extenso tejido ulcerado.

3.7. Análisis de las células infiltradas del sistema inmune.

El análisis de las células infiltradas del sistema inmune innato y adaptativo en el colon tras el tratamiento con DSS o con AOM/DSS, se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Previamente al análisis llevamos a cabo el aislamiento de las células infiltradas en colon o en los tumores, disgregando las células del epitelio y de los tumores.

3.7.1. Disgregación de las células tumorales.

El aislamiento y análisis de las células infiltradas del sistema inmune en los tumores se realizó a los 80 días de tratamiento con AOM/DSS tal y como se describe en el apartado 2.2.d. Cumplidos los 80 días se extrajeron los tumores inducidos en el colon de los ratones sometidos al tratamiento. En una placa de Petri y con ayuda de unas tijeras con las puntas afiladas, se desmenuzaron los tumores, se pasaron a un tubo falcon de 15 ml y se incubaron a 37°C con agitación suave en 2,5 ml de RPMI 1640 (Thermo Fisher) con FBS 10% (V/V), 2mM glutamina, colagenasa A (0,2 mg/ml, Roche), dispasa II (0,8 mg/ml, Thermo Fisher) y DNasa I (0,1 mg/ml, Roche) durante 50 min, volteando los tubos falcon cada 15 min. Una vez que observamos como el tejido se ha disgregado completamente, se pasó a través de un filtro de 70µM (Corning, 352350) con la ayuda del émbolo de una jeringuilla de 2 ml, y se lavó el filtro con 1ml de RPMI 1640 (Thermo Fisher) fresco para mejorar la recuperación de las células infiltradas. Una vez filtradas se centrifugaron 15 min a 4°C y 1.500 RPM en una centrifuga refrigerada (Heraeus Megafuge 2.0R) y el pellet se resuspendió en 500µl de FBS 3% (V/V) en PBS.

3.7.2. Disgregación de las células del epitelio intestinal.

Se extrajo el colon de ratones control y ratones tratados con DSS en las condiciones indicadas en el apartado 2.3.d., para el aislamiento de las criptas. Los cólores extraídos se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente en medio HBSS (Hank`s balanced salt solution medium, Thermo Fisher) con penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (0,1 mg/ml) en tubos falcon de 15 ml, para posteriormente trocearlos en secciones de unos 5 mm² sobre una placa de Petri con ayuda de un bisturí. Los cólores troceados se pasaron

a un tubo falcon de 15 ml y se incubaron durante 15 minutos a 37°C en 5 ml de medio HBSS que contiene 8mM EDTA, sin agitación. Después de la incubación se sustituyó el medio por 5 ml de medio HBSS fresco y las criptas intestinales se disgregaron mediante agitación vigorosa durante 1 minuto, para decantar el sobrenadante enriquecido en criptas sobre un tubo falcon nuevo de 50 ml, y el proceso se repitió hasta 5 veces. Las criptas se aislaron centrifugando los tubos falcon de 50 ml 15 min a 4°C y 1.500 RPM en una centrifuga refrigerada (Heraeus Megafuge 2.0R) y posteriormente se disgregaron incubando en 5ml de HBSS con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (0,1 mg/ml) y dispasa II (0,4 mg/ml, Thermo Fisher, 17105-041) durante 30 minutos a 37°C en un incubador orbital a 200 RPM. Tras la incubación con el medio de disgregación se comprobó en un microscopio óptico Leica DMI1 (Leica) que al menos el 70-80% de las criptas estaban disgregadas. Las proteasas se neutralizaron añadiendo al medio de disgregación FBS 5% (V/V). A continuación, se filtraron secuencialmente usando una gasa, filtro de 70µM (Corning, 352350) y filtro de 40 µM (Corning, 352340). Una vez filtradas se centrifugó 15 min a 4°C y 1.500 RPM en una centrifuga refrigerada (Heraeus Megafuge 2.0R) y se resuspendió el pellet en 500µl de FBS 3% (V/V) en PBS.

3.7.3. Citometría de flujo.

Las células infiltradas extraídas tal y como se describe en los apartados 3.7.1. y 3.7.2. se mantuvieron en FBS al 3% (V/V) en PBS y hielo. Se añadieron las distintas muestras obtenidas de cada ratón en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se centrifugó 5 min a 4°C y 1.300 RPM en una centrifuga refrigerada (Heraeus Megafuge 2.0R) para eliminar el sobrenadante. Cada muestra se resuspendió con 100 µl de mezcla de anticuerpos conjugados

(Tabla E) en FBS al 3% (V/V) en PBS, en función del panel que se iba a analizar, y se incubó durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Cada muestra se lavó con 100 µl de FBS al 3% (V/V) en PBS y se centrifugó 5 min a 4°C y 1.300 RPM en una centrifuga refrigerada (Heraeus Megafuge 2.0R) para eliminar el exceso de anticuerpo. En caso de que el panel contuviera algún anticuerpo conjugado a biotina, se reincubó cada muestra con Avidina-PeCF594 (Beckman Coulter, 562284) a una dilución 1/100 en FBS al 3% (V/V) en PBS, en las mismas condiciones en que se habían incubado los anticuerpos, y se lavó después el exceso del reactivo igual que se habían lavado los anticuerpos. Por último se resuspendieron las células en 100 µl de PFA 1% (p/V) en agua destilada para mantener las células fijadas hasta el momento del análisis, en que se pasaron a un tubo de citometría con 300 µl de FBS al 3% (V/V) en PBS y se analizaron las muestras en un citómetro *CYTOMICS FC 500 Analyzer* (Beckman Coulter), o un citómetro *GALLIOS Analyzer* (Beckman Coulter) dependiendo del panel diseñado. Los resultados se terminaron de analizar con el software Kaluza V1.5. (Beckman Coulter).

Tabla D. Anticuerpos utilizados para el análisis de las células por citometría de flujo.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Concentración	Dilución
B220-PE	Beckman Coulter	733307	0,2mg/ml	1/100
CD11b-PECy7	BioLegend	101216	0,05mg/ml	1/100
CD11c-Biotina	Pharmigen	553800	0,5mg/ml	
CD127-PE	eBioscience	12-1271-83	0,2mg/ml	1/200
CD127-PECy7	eBioscience	25-1271-82	0,05mg/ml	1/100
CD19-PE	Southern	1575-09L	0,1mg/ml	1/100
CD25-Biotina	BD Bioscience	553070	0,5mg/ml	1/200
CD25-FITC	Pharmigen	553072	0,125mg/ml	1/100
CD3-APC	BioLegend	100312	0,2mg/ml	1/100
CD3-PECy7	BioLegend	100320	0,2mg/ml	1/200
CD45-APC	eBioscience	17-0451-82	0,025mg/ml	1/100

CD45-PERCPCy5.5	BioLegend	103132	0,2mg/ml	1/200
CD4-APC	eBioscience	17-0042-83	0,2mg/ml	1/200
CD4-APCeF780	eBioscience	47-0042-82	0,2mg/ml	1/200
CD4-FITC	Beckman Coulter	731999	0,125mg/ml	1/100
CD69-PECy7	eBioscience	25-0691-82	0,2mg/ml	18264
CD8-eF450	eBioscience	48-0081-82	0,05mg/ml	1/100
CD8-PECy7	BioLegend	100722	0,2mg/ml	1/200
F4/80-APC	eBioscience	17-4801-82	0,4mg/ml	
F4/80-Biotina	eBioscience	13-4801-85	0,5mg/ml	1/100
I-Ab (MHCII)-FITC	BioLegend	116406	0,5mg/ml	1/100
Ly6C-Biotina	Beckman Coulter	732233	0,5mg/ml	1/100
Ly6C-FITC	BioLegend	128005	0,2mg/ml	1/100
Ly6G-PE	Pharmigen	551461	0,2mg/ml	
NK1.1-FITC	Pharmigen	553164	0,5mg/ml	1/200
SiglecF-PE	BD Bioscience	552126	0,2mg/ml	1/200
TCR $\alpha\beta$ -FITC	Beckman Coulter	732247	0,1mg/ml	1/100
TCR $\gamma\delta$ -PE	Pharmigen	553178	0,2mg/ml	1/100

3.8. Array de proteínas.

Empleamos el kit *Mouse XL Cytokine Array* (R&D systems) para la detección de los niveles de expresión de 111 citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Para ello se hicieron grupos de 6 ratones de entre 10 y 14 semanas que tratamos con DSS como se indica en el apartado 2.3.g. Para este ensayos usamos 4 líneas distintas de ratón: WT, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Una vez alcanzadas las condiciones indicadas se sacrificaron los ratones con CO₂ y se tomó el colon entero de los ratones. Se obtuvo el extracto proteico del colon de cada ratón como se indica en el apartado 3.1. Se tomaron 50 μ g de cada uno de los 6 ratones por línea para obtener una única mezcla proteica por línea de 300 μ g. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se incubaron las membranas con estas

mezclas proteicas (una membrana por cada genotipo), y posteriormente con el cóctel comercial para la detección de las proteínas, suministrado con el kit. Se visualizó la señal en películas quimiosensibles en una máquina de revelado *SRX-101*. Posteriormente se cuantificó la expresión de las 111 proteínas por densitometría con el software *imageJ2* mediante el macro *Protein Array Analyzer*.

3.9. Ensayo de permeabilidad intestinal.

Para determinar la permeabilidad del intestino de ratones en condiciones basales, tras el tratamiento con DSS en las condiciones que se indican en el apartado 2.3.e., o tras la radiación como se indica en el apartado 2.4., recurrimos a una técnica basada en la medida de la concentración en suero de una sonda fluorescente administrada oralmente a los ratones. Mediante una cánula y por vía oral, se les administra a los ratones Dextrano-FITC (D-FITC) (44 mg / 100 g de peso) (Sigma-Aldrich, FD4) disuelto en PBS, tras haberlos dejado previamente 8 horas sin agua. 4 horas después de administrarles el D-FITC se sacrificaron los ratones con CO₂ y se obtuvieron muestras de sangre para cada ratón por punción cardíaca. Las muestras de sangre se mantuvieron a 37°C durante media hora para facilitar la separación del suero y se centrifugaron 5 minutos a 4°C y 5.000 RPM en una centrifuga de mesa (Mikron 200R Hettich zentrifuggen). Se recogió el suero de cada una de las muestras, situado en la parte superior. Para obtener los datos de concentración establecimos una recta patrón a partir del mismo D-FITC administrado a los ratones con los siguientes puntos: 60 µg/ml, 40 µg/ml, 30 µg/ml, 20 µg/ml, 15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml y 0,325 µg/ml. Tanto para la recta patrón como para los blancos se utilizó suero de ratones que no habían sido sometidos a ningún tratamiento. Una vez preparados las muestras, los blancos

y los distintos puntos de la recta patrón, se tomaron 100 μ l de cada uno en un pocillo de una placa de 96 de fondo plano y se mezclaron con 100 μ l de PBS para evitar interferencias de la hemoglobina y se midió la fluorescencia en una placa de 96 pocillos de fondo plano mediante un espectrofluorímetro *EnVision 2104 Multilabel Reader*.

Resultados

Resultados.

1. Papel de p38 γ y p38 δ en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis.

Los mecanismos moleculares que relacionan el cáncer con la inflamación crónica aún no están del todo claros hoy en día (Balkwill and Mantovani, 2001; Grivennikov et al., 2010). Las p38MAPKs están involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria y por ende en los procesos implicados en el desarrollo y progreso del cáncer. Estudios publicados previamente por el grupo demostraron el papel pro-oncogénico de las p38 γ y p38 δ , ya que su eliminación causaba una menor incidencia de CAC en un modelo de ratón (Del Reino et al., 2014). Además otros estudios han demostrado que en fibroblastos las p38 γ y p38 δ pueden jugar un papel anti-tumorigénico (Cerezo-Guisado et al., 2011). Dado que el papel de p38 γ y p38 δ en el desarrollo del cáncer parece depender del contexto celular en el que se encuentran, decidimos estudiar el papel de dichas p38MAPKs en dos compartimentos celulares implicados en el desarrollo de CAC, el epitelio intestinal y la línea celular mieloide. Para ello utilizamos dos ratones “Knockout” (KO) condicionales: el ratón VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, generado como se indica en el apartado 2.1. de materiales y métodos; y el ratón LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Zur et al., 2015).

1.1. Caracterización de las líneas de ratones KO condicionales VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$.

En experimentos previos al desarrollo de la tesis, quisimos comprobar que los ratones WT y los ratones p38 $\gamma/\delta^{\text{Flox/Flox}}$, los ratones que se usaron en los cruces

para obtener ambas líneas KO condicionales, se comportaban fenotípicamente de manera similar de cara a poder usarlos indistintamente como controles para los siguientes experimentos. Uno de los estudios que realizamos fue comparar mediante western blot los niveles de expresión de p38 γ y p38 δ en el colon de ambos genotipos, usando además extractos del colon de ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ como control negativo (Fig R1A). Al no encontrar diferencias en la expresión de las p38 γ y p38 δ entre los ratones WT y los p38 $\gamma/\delta^{\text{Flox/Flox}}$ decidimos usarlos por igual en nuestros experimentos, a no ser que se indique lo contrario, refiriéndonos a ambos como WT.

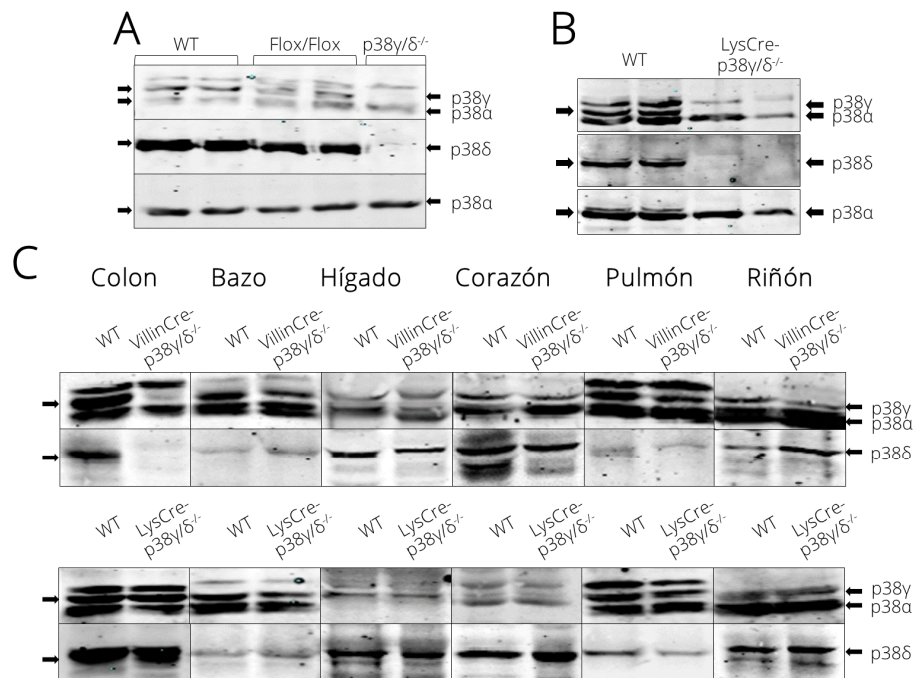


Fig R1. Niveles de expresión de p38 γ y p38 δ en los KO condicionales VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$: Las proteínas indicadas se inmunodetectaron en extractos de (A) colon, (B) macrófagos peritoneales, o (C) distintos órganos de ratones WT, Flox/Flox, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ o p38 $\gamma/\delta^{-/-}$.

El siguiente punto fue corroborar por western blot la delección selectiva de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide (macrófagos peritoneales) en el caso de los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R1B) y en el epitelio intestinal (colon) para el caso de los

VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R1C), sin afectar a la expresión en otros órganos (bazo, hígado, corazón, pulmón y riñón).

Comprobada la correcta ausencia de expresión de las p38 γ y p38 δ en las líneas de ratones KO condicionales, analizamos si la delección de las p38MAPKs causaba cambios morfológicos en el colon, para lo cual teñimos secciones de colon con H&E y además, medimos la longitud de las criptas de los ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R2A, R2B). No observamos ninguna diferencia en la morfología general del colon entre los ratones p38 γ / $\delta^{\text{Flox/Flox}}$, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$. Cuando determinamos la longitud de las criptas encontramos que estas eran un poco más largas en el caso de los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ respecto a los WT. El siguiente paso fue analizar los tres tipos principales de células diferenciadas que conforman el epitelio del colon: las células caliciformes, las células enteroendocrinas, y los enterocitos. Se prepararon secciones de colon de los ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y se tiñeron con PAS para identificar y cuantificar las células caliciformes (Fig R2C), responsables de la secreción del moco protector que recubre el epitelio intestinal, y se midió por qPCR el nivel de expresión de mRNA de *MUC-2* (Fig R2D), la mucina principal que compone dicho moco. También se analizó mediante qPCR los niveles de expresión de mRNA de *cromogranina A* (ChgA) (Fig R2E) y de la *fosfatasa alcalina* (ALP) (Fig R2F), marcadores de las células enteroendocrinas y los enterocitos respectivamente.

Estos resultados indican que ambos ratones KO condicionales, los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, no presentan aparentemente ninguna diferencia fenotípica a nivel basal respecto los ratones WT, por lo que las

diferencias que encontramos se deberían únicamente a la distinta respuesta a los estímulos.

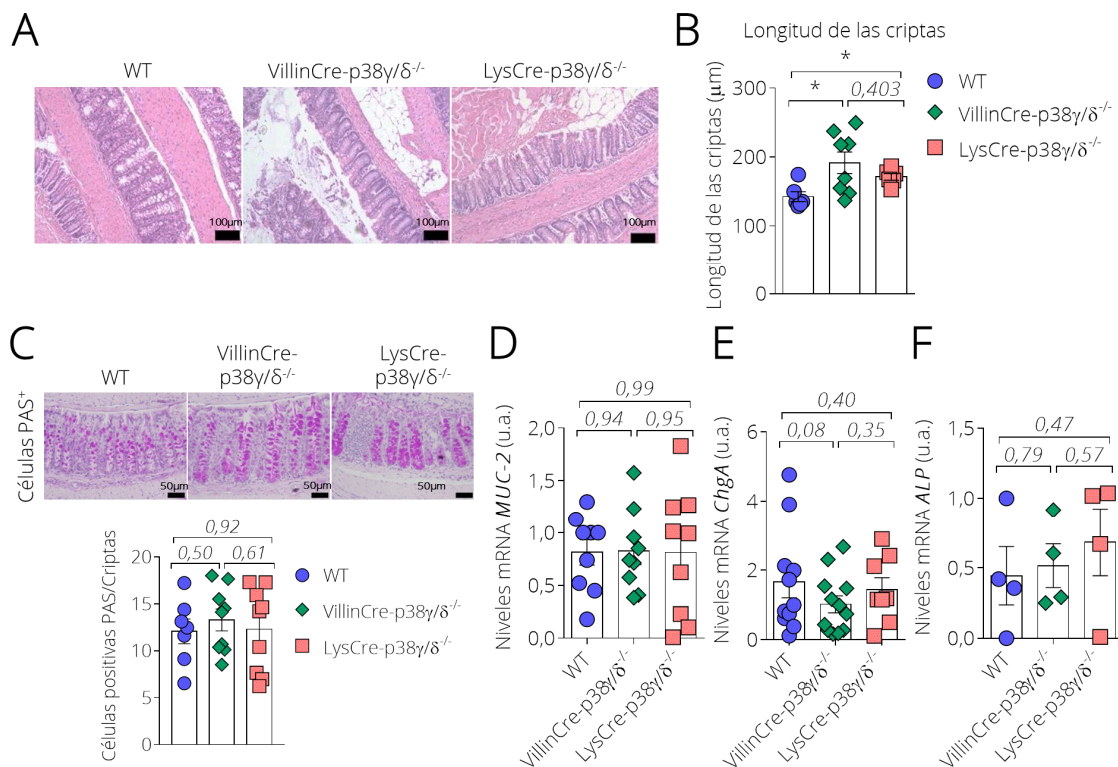


Fig R2. Análisis del estado basal del epitelio del colon: **(A)** Secciones de colon se tiñeron con hematoxilina-eosina y se midió la longitud de las criptas desde la parte basal a la apical. **(B)** Longitud de las criptas. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de al menos 80 medidas por ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=7-8 ratones) * $p \leq 0.05$. **(C)** Secciones de colon se tiñeron con ácido peryódico de Schiff (PAS) y se contabilizaron las células PAS $^{+}$ por cripta. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de la cuantificación de al menos 30 criptas. Las barras representan la media \pm SEM (n=7-9 ratones). **(D), (E), (F)** La expresión relativa de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR en el colon de ratones y se normalizo frente a la expresión de mRNA de GAPDH. Cada punto representa a un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=4-12 ratones).

1.2. La incidencia de tumores generados es mayor en los ratones VillinCre-p38 γ / δ ^{-/-} y menor en los LysCre-p38 γ / δ ^{-/-} comparada con los WT.

Para la generación de CAC usamos el modelo de AOM/DSS como se describe en el apartado 3.1. de Materiales y métodos (Fig R3A). A lo largo del tratamiento monitorizamos la pérdida de peso como un síntoma del desarrollo de la patología y de la severidad de la misma, de forma que una mayor pérdida de peso supone mayor gravedad. Como hemos indicado previamente, estudiamos por separado los ratones WT y los p38 γ / δ ^{Flox/Flox} en respuesta al tratamiento, y no encontramos ninguna diferencia ni en la curva de peso durante el tratamiento (Fig R3B), ni en el número de tumores generados a los 80 días (Fig R3C). Esta fue la principal razón que nos llevó a usar los ratones WT y p38 γ / δ ^{Flox/Flox} como controles de manera indistinta.

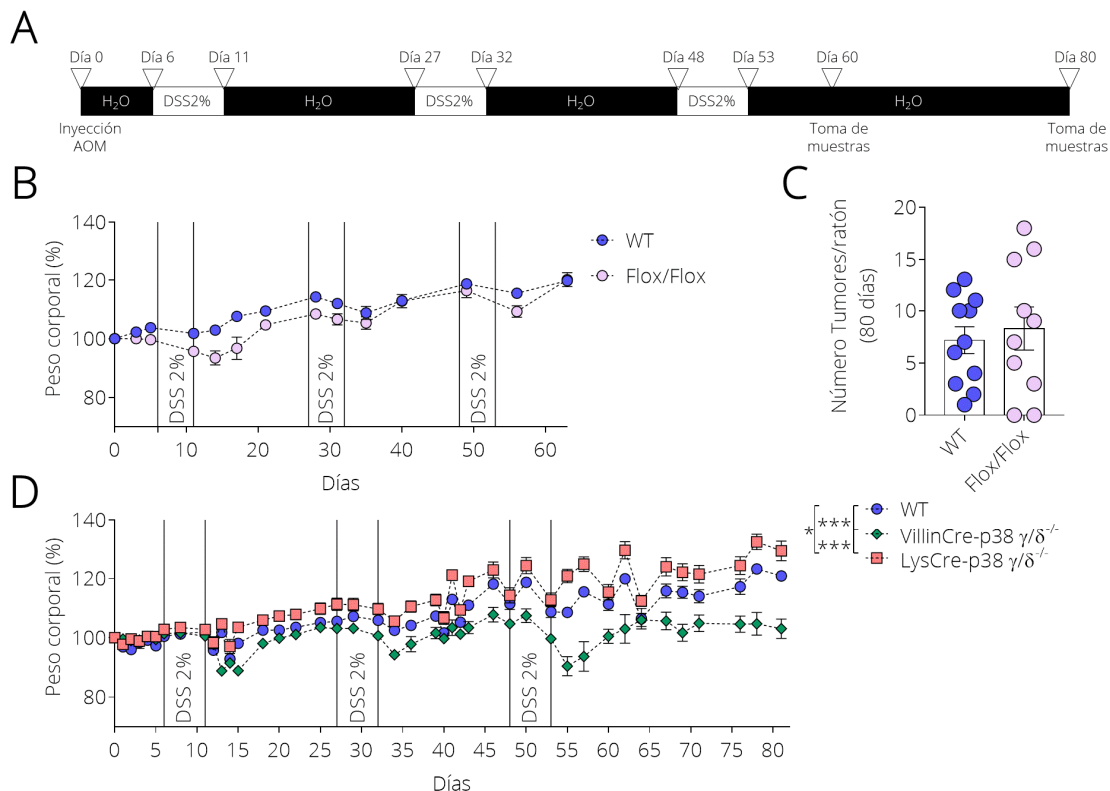


Fig R3. Evolución del peso de los ratones WT, VillinCre-p38 γ / δ ^{-/-} y LysCre-p38 γ / δ ^{-/-} con el tratamiento de AOM/DSS para inducir CAC: (A) Esquema del tratamiento con AOM/DSS. En blanco se indican los periodos en los que los ratones tomaron DSS 2% y en negro con Agua.

Las flechas indican los días en los que se inyectó AOM (10mg/Kg de peso) intraperitonealmente, cuando se iniciaron y finalizaron los ciclos de DSS2% y los días a los que se tomaron las muestras. **(B) y (D)** Gráfica del peso de los ratones durante el tratamiento con AOM/DSS. Las barras coinciden con los días de tratamiento con DSS. Cada punto representa la media de los porcentajes de los pesos tomados a ese día. Los resultados representan media \pm SEM (n=10-12 ratones en el caso de B y n=17-23 ratones en el caso de D). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. **(C)** Número de tumores detectados en los colones de ratones WT y Flox/Flox a los 80 días de tratamiento con AOM/DSS. Cada punto representa un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=10-11 ratones).

Cuando aplicamos el modelo de AOM/DSS en los grupos de ratones WT, VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$, observamos que tras los 80 días de tratamiento los ratones WT y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ llegan a tener una ganancia del 20% en peso respecto al inicio, mientras que los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ no muestran ninguna ganancia en peso al final del tratamiento. La diferencia de peso entre los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ llega a alcanzar el 30% del peso inicial (Fig R3D). Por tanto a nivel sintomatológico, los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ son aparentemente más sensibles al tratamiento con AOM/DSS que el resto de genotipos.

Definidos los puntos de toma de datos como los días 60 y día 80 de tratamiento con AOM/DSS, extrajimos el colon de los ratones. A simple vista se observa que los tumores generados están concentrados en su mayoría en la zona distal del colon. Estos son más evidentes en las muestras tomadas a día 80 del tratamiento (Fig R4A). Mediante cortes histológicos obtenidos a partir de los tumores a día 80 del tratamiento con AOM/DSS determinamos que todos los tumores eran de tipo adenocarcinoma, y que en ninguno de los casos penetran en la capa muscular (Fig R4B). Contabilizamos el número de tumores encontrados macroscópicamente tanto a día 60 como a día 80. Comparando el número de tumores por ratón observamos que a día 60 los 3

genotipos presentan tumores aunque el número de tumores en los ratones Villin-Cre p38 γ /δ^{-/-} fue significativamente mayor que en los WT y los LysCre-p38 γ /δ^{-/-} (Fig R4C). A día 80, el número de tumores es mayor en los 3 genotipos comparados con los observados a día 60. Los ratones Villin-Cre p38 γ /δ^{-/-} siguen presentando más tumores que los WT, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa, sin embargo los ratones LysCre-p38 γ /δ^{-/-} presentan significativamente menos tumores que los VillinCre-p38 γ /δ^{-/-} y que los WT a día 80 (Fig R4C).

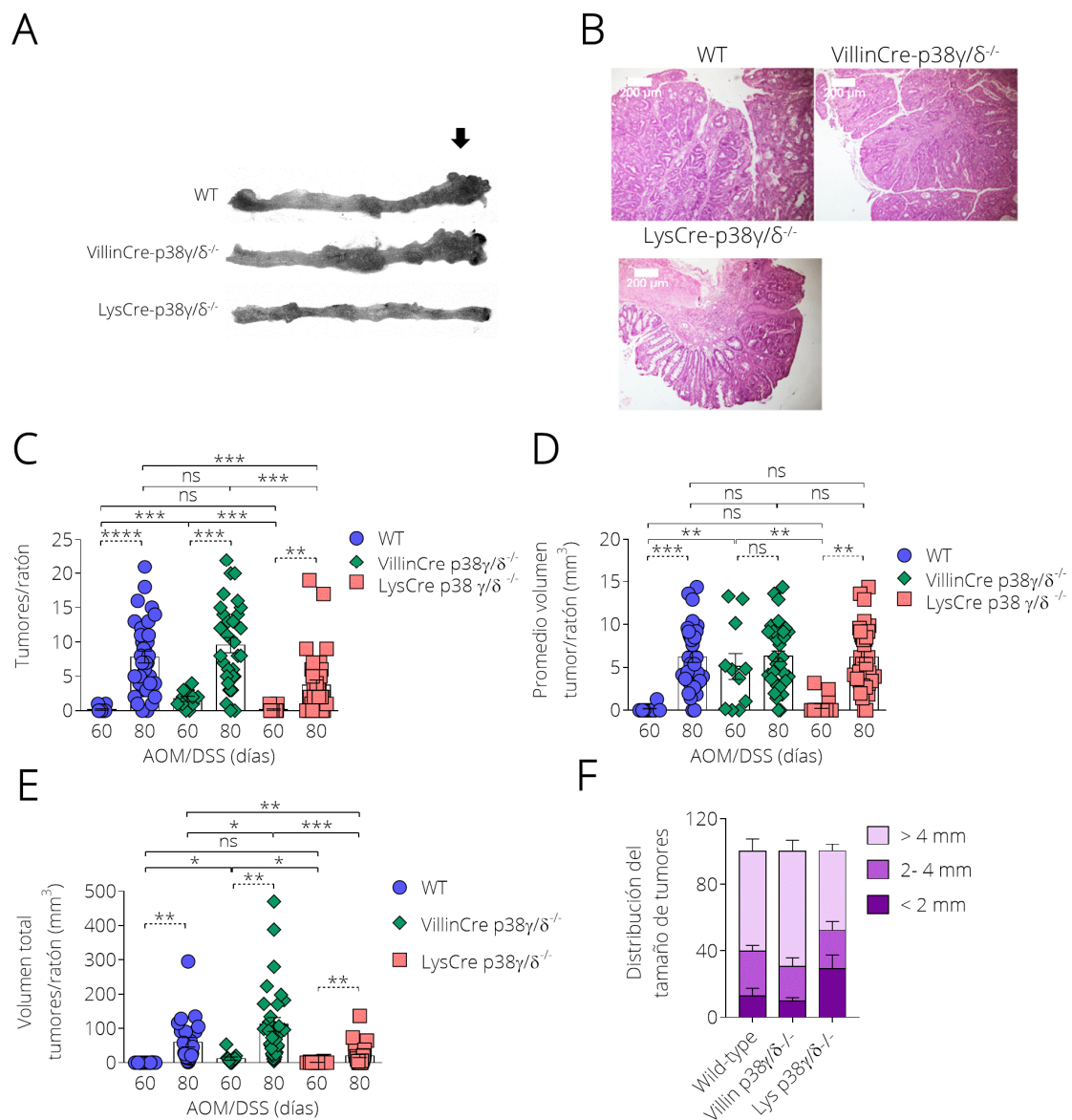


Fig R4. Desarrollo de tumores en el colon de ratones WT, VillinCre-p38 γ /δ^{-/-} y LysCre-p38 γ /δ^{-/-} tras el tratamiento de AOM/DSS: Tras el tratamiento con AOM/DSS se tomaron muestras a los

60 y 80 días. **(A)** Fotografía representativa de los colones de los ratones WT, VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ a día 80. La flecha señala la parte distal del colon. **(B)** Secciones de colones de los ratones WT, VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ se tiñeron con H&E. **(C)** Número de tumores, **(D)** Media del volumen de los tumores, **(E)** Volumen total de tumor por ratón, **(F)** Distribución del tamaño de los tumores a día 80. Cada punto representa un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=17-23 ratones). ns= no significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Adicionalmente medimos el tamaño de los tumores encontrados macroscópicamente tanto a día 60 como a día 80 (Fig R4D-F). Ya a día 60 los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ no solo presentan más tumores que los WT y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$, sino que además estos son más grandes. A día 80, aunque no existen diferencias en el volumen promedio de los tumores entre los 3 genotipos (Fig R4D), el volumen total de los tumores de los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ fue mayor que el de los WT y los LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ (Fig R4E). Además el volumen total de los tumores de los LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ fue a su vez menor que el de los WT. Cuando analizamos cómo se distribuyen los tumores en función de su volumen a día 80 (Fig R4F), observamos que más del 50% de los tumores de los ratones WT y VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ presentaron un volumen mayor de 4mm^3 , llegando casi hasta el 75% de los tumores en el caso de los VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$. Por el contrario los tumores de los LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ se distribuyen casi a partes iguales entre aquellos mayores de 4mm^3 , y los menores o iguales a 2mm^3 .

Estos resultados indican que los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ son los primeros en presentar tumores distinguibles de manera macroscópica y de mayor tamaño a los demás, y que los ratones LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ no solo presentan menos tumores, sino que además estos son más pequeños en comparación a los WT y los VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$.

1.3. p38 γ y p38 δ regulan la proliferación y la apoptosis de las células tumorales.

Para elucidar el mecanismo por el que las p38MAPKs afectan el desarrollo de CAC analizamos la proliferación y la apoptosis de las células del tumor como se indica en el apartado 3.6.4. de materiales y métodos.

Estudiamos la proliferación de las células tumorales a dos tiempos del tratamiento con AOM/DSS: a un tiempo temprano como los 60 días, cuando los VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentaban un número considerable de tumores comparado con los otros dos genotipos; y a los 80 días, en que los 3 genotipos tienen un número apreciable de tumores.

Conforme a lo esperado, los tumores que muestran mayor proliferación celular a los 60 días son los encontrados en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R5A-B). También observamos que la proliferación en los tumores WT es mayor que en los tumores de los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa. A día 80 después del tratamiento, la proliferación disminuye en los 3 genotipos con respecto a la observada a los 60 días. Los tumores de los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentaron una proliferación mayor comparados con los tumores de los WT y de los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, y la proliferación de los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ es menor que la de los WT (Fig R5A-B).

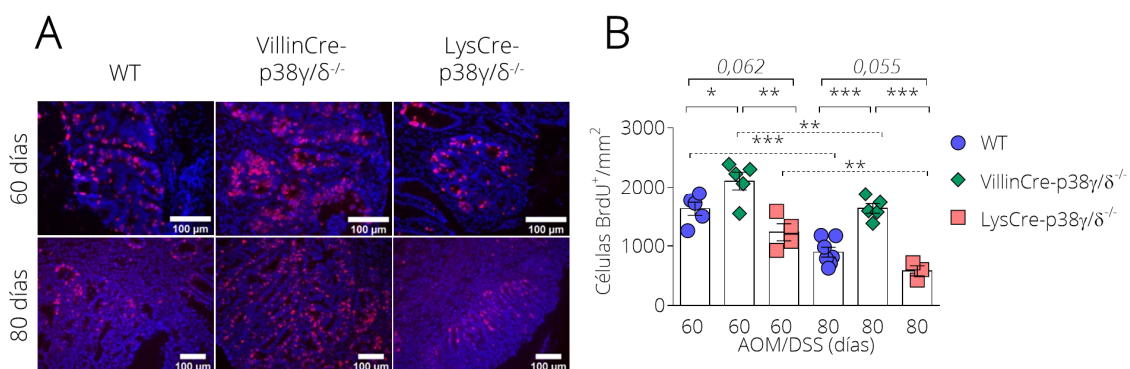


Fig R5. Proliferación celular en los tumores de ratones WT, VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ tras el tratamiento de AOM/DSS: **(A)** Imágenes representativas de secciones de colon de ratones WT, VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ tratados con AOM/DSS recogidas a día 60 y 80. Las secciones se tiñeron con anti-BrdU (rojo) y Hoechst (azul) para detectar las células proliferativas y los núcleos, respectivamente, por microscopía de fluorescencia. **(B)** Células BrdU⁺ por mm² detectadas. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de las cuantificaciones de al menos 20 campos por ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=4-7). *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001.

Simultáneamente al estudio de la proliferación en tumores de 60 y 80 días tras el tratamiento con AOM/DSS, analizamos por microscopía de fluorescencia los niveles de muerte celular por apoptosis en los tumores teñidos mediante TUNEL.

A día 60 observamos que la muerte celular en los tumores de los ratones LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ fue menor comparada con la observada en los tumores de los WT y VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ (Fig R6A-B). A día 60, la muerte de las células tumorales de los ratones del genotipo VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y WT fue similar.

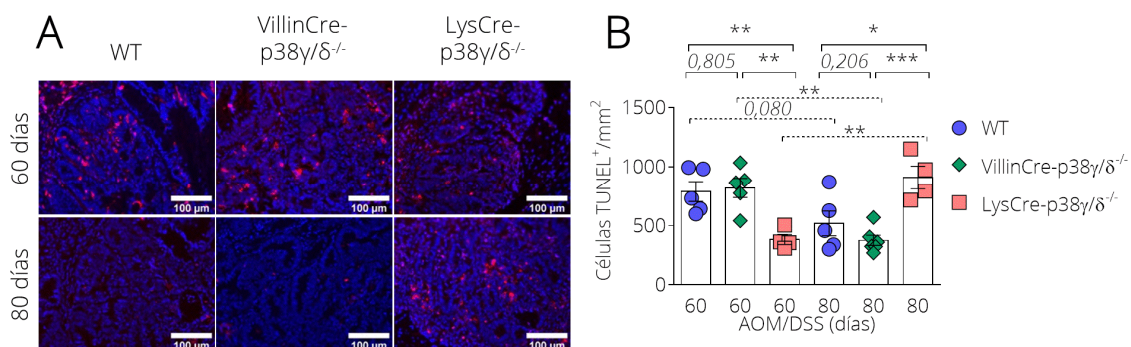


Fig R6. Muerte celular en los tumores de ratones WT, VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ tras el tratamiento de AOM/DSS: **(A)** Imágenes representativas de secciones de colon de ratones WT, VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ tratados con AOM/DSS recogidas a día 60 y 80. Las secciones se tiñeron con TUNEL (rojo) y Hoechst (azul) para detectar las células apoptóticas y los núcleos, respectivamente, por microscopía de fluorescencia. **(B)** Células TUNEL⁺ por mm² detectadas. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de las

cuantificaciones de al menos 20 campos por ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=4-7). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

A los 80 días del tratamiento, punto en el que observamos que se atenúa la proliferación de las células tumorales, los tumores de los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentaron unos valores de apoptosis celular significativamente superiores a los que presentaron los tumores de los WT y los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$. Además, en los tumores de los genotipos WT y VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ a día 80 se reducen los valores de muerte celular hasta casi la mitad de los que presentaban a día 60. De nuevo, a día 80 los valores de apoptosis en los tumores de los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y WT fue similar.

Estos resultados indican que la tumorigénesis está favorecida en los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ con respecto a los WT y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ tanto en una etapa temprana como en etapas posteriores del desarrollo tumoral. Por su parte los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, al tener más activas las vías apoptóticas en las células tumorales, la tumorigénesis se encuentra reducida.

1.4. p38 γ y p38 δ controlan el reclutamiento de células del sistema inmune en los tumores de CAC.

Una vez determinado el efecto de la falta de p38 γ y p38 δ en el crecimiento de los tumores, la proliferación de las células tumorales, así como en los niveles de muerte celular de las células tumorales; y dado que tanto la inflamación como las distintas células del sistema inmune juegan un papel muy importante en el desarrollo tumoral, analizamos distintas poblaciones de células del sistema inmune que han infiltrado los tumores a los 80 días del tratamiento, mediante citometría de flujo (Fig R7A, R8A).

Usamos el marcador de leucocitos (CD45⁺) como primer filtro para el análisis de las demás poblaciones infiltrantes en los tumores. Los tumores de los LysCre-p38γ/δ^{-/-} muestran mayor infiltración de leucocitos que los de los otros dos genotipos (Fig R7B), sobre todo que los de los WT. La alta variabilidad en los resultados de los VillinCre-p38γ/δ^{-/-} impide que las diferencias observadas con los LysCre-p38γ/δ^{-/-} sean significativas.

Tras la selección positiva de la población CD45⁺, seleccionamos la población de células mieloides (CD45⁺CD11b⁺), de la cual analizamos la distribución de las MDSC (Fig R7A). Las MDSC no son un tipo de células homogéneas, son un grupo heterogéneo de células con morfologías similares a monocitos (M-MDSC, CD45⁺CD11b⁺ Ly6C⁺) o granulocitos (G-MDSC, CD45⁺CD11b⁺ Ly6G⁺) (Fig R7A) que han adquirido una potente actividad inmunosupresora (Youn and Gabrilovich, 2010; Kumar et al., 2016; Zhao et al., 2016; De Sanctis et al., 2016). Aunque no encontramos diferencias en los porcentajes de las células mieloides (CD45⁺CD11b⁺) infiltradas en los tumores de los 3 genotipos (Fig R7C), los tumores de los ratones VillinCre-p38γ/δ^{-/-} presentaron un mayor porcentaje de M-MDSC en comparación a los de los WT y los LysCre-p38γ/δ^{-/-} (Fig R7D). Respecto a la población de G-MDSC, aunque la infiltración de estas células fue menor en los tumores de los VillinCre-p38γ/δ^{-/-}, las diferencias entre los 3 genotipos no llegan a ser significativas (Fig R7E). Por último también analizamos los porcentajes de los macrófagos asociados a los tumores (TAM, CD45⁺CD11b⁺ F4/80⁺) (Fig R7A), los cuales presentaron unos porcentajes similares para los 3 genotipos (Fig R7F).

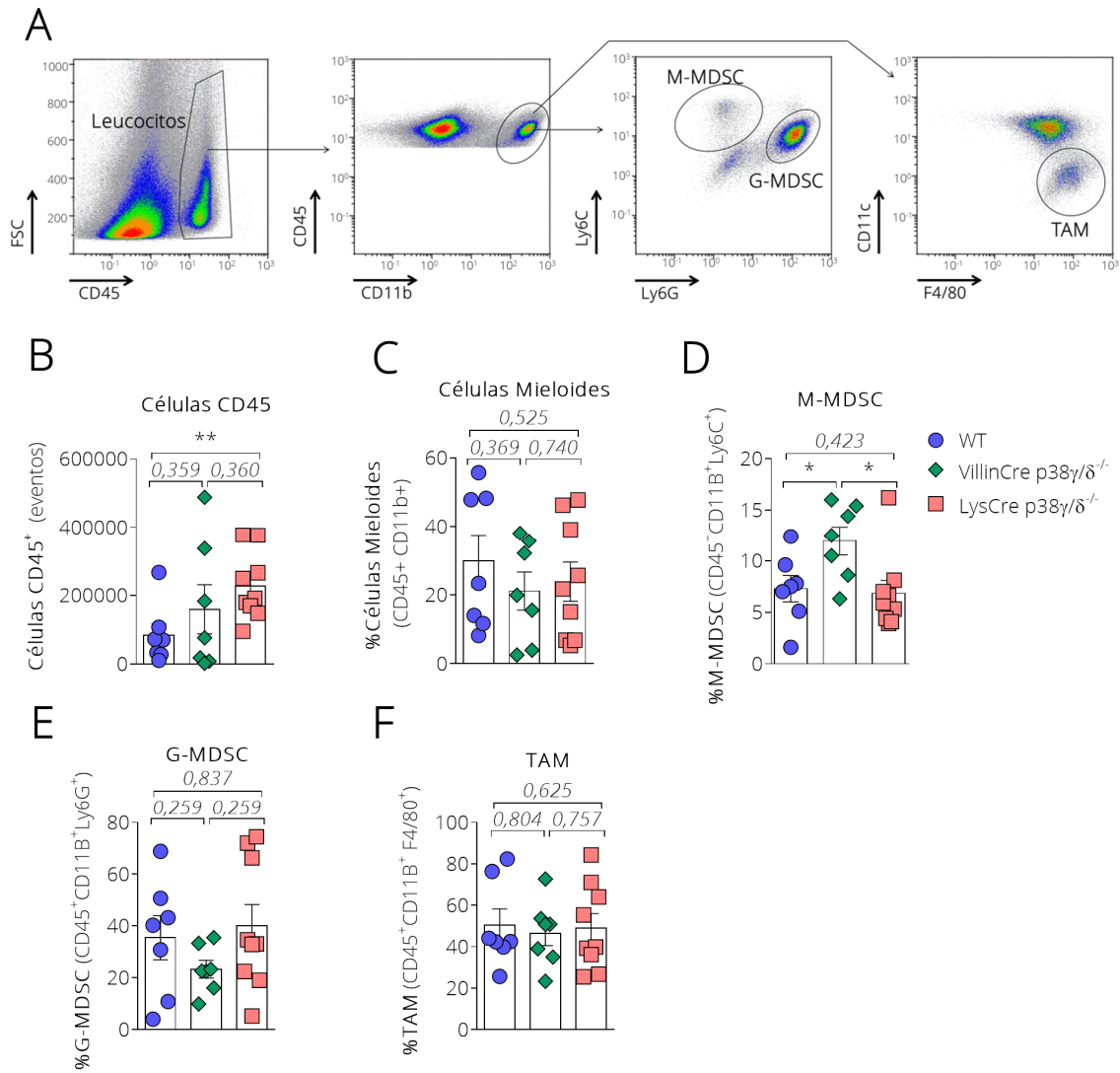


Fig R7. Caracterización de las poblaciones de origen mieloide infiltradas en los tumores de CAC: Los ratones WT, VillinCre-p38γ/δ^{-/-} y LysCre-p38γ/δ^{-/-} se trataron con AOM/DSS para inducir CAC. A los 80 días se recogieron los tumores, se disgregaron y se identificaron mediante citometría de flujo las células infiltradas de origen mieloide conforme a los marcadores celulares indicados. **(A)** Panel representativo del marcaje y análisis realizados para cuantificar las distintas poblaciones de la línea mieloide **(B)-(F)** Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es el número o porcentaje de las células infiltradas en los tumores de un solo ratón. Las barras representan la media ± SEM (n=5-9 ratones) *p≤0,05; **p≤0,01.

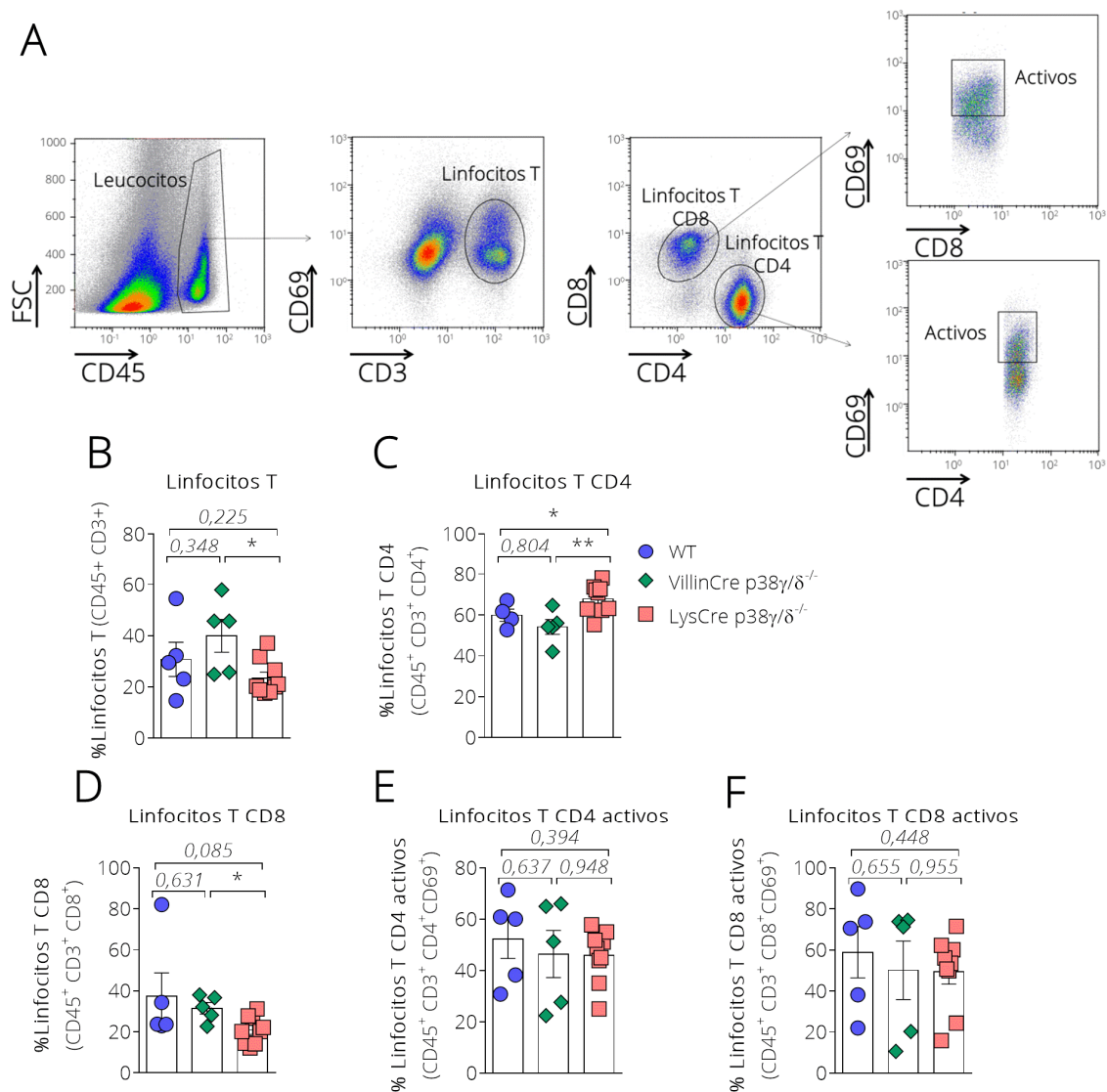


Fig R8. Caracterización de las poblaciones de origen linfocítico infiltradas en los tumores de CAC: Los ratones WT, VillinCre-p38 γ / δ ^{-/-} y LysCre-p38 γ / δ ^{-/-} se trataron con AOM/DSS para inducir CAC. A los 80 días se recogieron los tumores, se disgregaron y se identificaron mediante citometría de flujo las células infiltradas de origen linfocítico conforme a los marcadores celulares indicados. **(A)** Panel representativo del marcaje y análisis realizados para cuantificar las distintas poblaciones linfocitos T. En **(B)-(H)** Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es el número o porcentaje de las células infiltradas en los tumores de un solo ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=5-9 ratones) *p \leq 0,05;**p \leq 0,01.

Paralelamente al análisis de las distintas poblaciones mieloides, se examinaron las poblaciones de linfocitos T en los tumores a los 80 días del tratamiento con AOM/DSS, para ello seleccionamos las células positivas para el marcador de

linfocitos T (CD3⁺) a partir de los leucocitos (células CD45⁺) (Fig R8A) y separamos las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ (CD45⁺CD3⁺ CD4⁺) y de linfocitos T CD8⁺ (CD45⁺CD3⁺ CD8⁺). Por último dentro de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ diferenciamos cuales están en estado activo (CD45⁺CD3⁺ CD4⁺ CD69⁺ o CD45⁺CD3⁺ CD8⁺ CD69⁺) (Fig R8A). El porcentaje de linfocitos T infiltrados en los tumores de los LysCre-p38γ/δ^{-/-} fue menor respecto a los de los otros 2 genotipos, aunque solo la diferencia con respecto a los tumores VillinCre-p38γ/δ^{-/-} fue estadísticamente significativa (Fig R8B). Analizando cómo se distribuyen las poblaciones de estos Linfocitos T, observamos que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ fue mayor en los tumores de los LysCre-p38γ/δ^{-/-} que en los de los WT y los VillinCre-p38γ/δ^{-/-} (Fig R8C), y que ocurre lo contrario en el caso de los linfocitos T CD8⁺ (Fig R8D). Entre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ infiltrados en los tumores de WT y VillinCre-p38γ/δ^{-/-} no existe ninguna diferencia (Fig R8C, R8D). En cuanto a los porcentajes de las poblaciones de Linfocitos T en estado activo, tanto para los linfocitos T CD4⁺ como para los CD8⁺, no parece haber ninguna diferencia entre los 3 genotipos (Fig R8E, R8G).

Los resultados indican que los VillinCre-p38γ/δ^{-/-} presentan un mayor porcentaje de M-MDSC respecto a los demás genotipos, lo que supondría que los ratones se encuentran más inmunosuprimidos. Por otra parte, si atendemos a los datos obtenidos respecto a las poblaciones de los linfocitos T, estos nos indicarían que los ratones LysCre-p38γ/δ^{-/-} tienen un mayor porcentaje de linfocitos T de carácter cooperador en detrimento de los citotóxicos.

1.5. p38 γ y p38 δ modulan los niveles de expresión del mRNA de diversas proteínas relacionadas con el desarrollo de CAC.

La inflamación crónica desarrollada tras ciclos repetidos de DSS, es uno de los principales promotores del desarrollo tumoral en el modelo en el que estamos trabajando. Por ello hemos analizado por qPCR la expresión del mRNA de un gran número de citoquinas relacionadas con procesos pro- y anti-inflamatorios, así como de quimioquinas relacionadas con el reclutamiento de distintas células del sistema inmune, y de otras proteínas relacionadas con la tumorigénesis. Hemos analizado los niveles de mRNA de los genes para las siguientes proteínas: *TNF α* , *IL1 β* , *TGF β* , *IL10*, *IL6*, *IFN γ* , *S100A8*, *S100A9*, *CCL5*, *CXCL10*, *CCL25*, *CCL9*, *IL-11*, *COX2*, *c-Myc*, *iNOS* e *HIF1*. Este análisis se llevó a cabo en extractos de colon obtenidos a día 60 del tratamiento con AOM/DSS (Fig R9).

Para la mayoría de los mRNAs estudiados: *TNF α* , *IL-6*, *IFN γ* , *S100A8*, *S100A9*, *CCL5*, *CXCL10*, *CCL9*, *IL-11*, *COX2*, *c-Myc*, *iNOS* e *HIF1 α* (Fig R9A-M), no observamos diferencias notables en su expresión entre el colon de los ratones WT, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ o LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Aunque los niveles de mRNA de *S100A8* y *S100A9* en WT son mayores que en VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa (Fig R9D-E). Por otro lado *IL-11* muestra menor inducción en LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ comparado con WT y VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ con diferencias casi significativas (Fig R9I).

Sin embargo para algunas de las proteínas analizadas sí que encontramos diferencias de expresión en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ o LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tienen por un lado mayor inducción de *IL-1 β* respecto a los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R9N), y por el otro presenta menor

nivel de mRNA para *IL-10* respecto a WT y LysCre-p38 γ / δ ^{-/-} (Fig R9O). Por su parte los ratones LysCre-p38 γ / δ ^{-/-} tienen mayor inducción de *TGF- β* y *CCL25* respecto a los ratones WT y VillinCre-p38 γ / δ ^{-/-} (Fig R9P-Q).

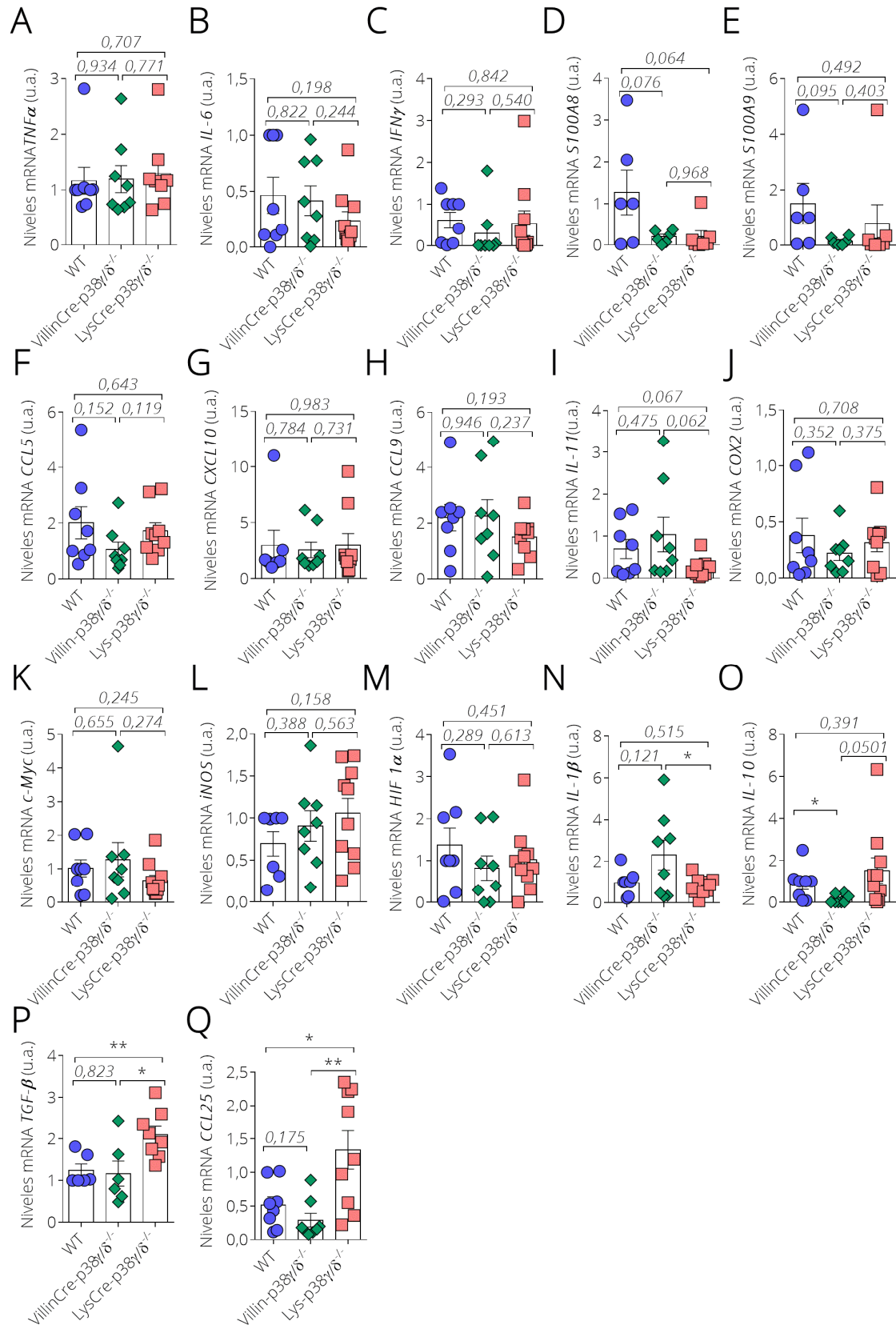


Fig R9. Niveles de expresión de mRNA de diversas proteínas relacionadas con el desarrollo de CAC: La expresión relativa de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR en el colon de ratones a los 60 días de tratamiento con AOM/DSS, y se normalizó frente a la expresión de mRNA de GAPDH. Cada punto representa un ratón Las barras representan la media \pm SEM (n=8-10 ratones) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Estos resultados indican que p38 γ y p38 δ regulan diferencialmente la expresión de quimioquinas y de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, de forma específica y dependiendo del compartimento celular.

2. Papel de p38 γ y p38 δ en la colitis ulcerosa.

A continuación, decidimos analizar el papel de las p38 γ y p38 δ en la colitis ulcerosa (UC) inducida por el tratamiento con DSS tal y como se indica en el apartado 4.1. de Materiales y métodos (Fig R10A). Mediante este modelo podemos estudiar los procesos que se desencadenan con la respuesta inflamatoria aguda en tiempos cortos así como la recuperación del tejido tras el daño inducido.

2.1. Los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan mayor índice de inflamación, más úlceras y de mayor tamaño que los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y los WT tras el tratamiento con DSS.

El peso de los ratones se monitorizó durante el tratamiento con DSS y 5 días posteriores al tratamiento (Fig R10A). Se observó que los tres grupos (WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$) comenzaron a sufrir una bajada de peso partir de los días 3 y 4 del tratamiento (Fig R10B). A día 8 los pesos de los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ empezaron a estabilizarse, e incluso llegaron a ganar peso a día 10, mientras que los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y WT siguieron

perdiendo peso (Fig R10B). Este resultado indica que el epitelio intestinal de los ratones $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ podría ser menos susceptible a la irritación que provoca el tratamiento con DSS o que los mecanismos de regeneración en esta línea de ratón son más efectivos.

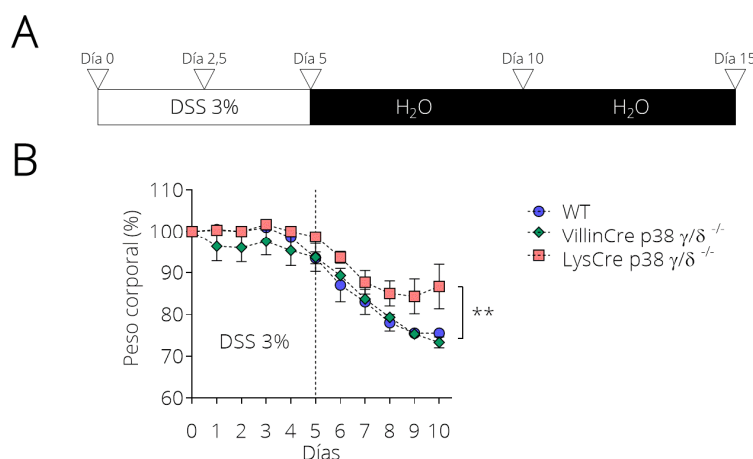


Fig R10. Modelo de colitis ulcerosa: (A) Esquema del tratamiento con DSS, en blanco se indica el periodo en los que los ratones tomaron DSS 3% y en negro con agua. Las flechas indican los días en que se iniciaron y finalizaron los ciclos de DSS3% o los días a los que se tomaron las muestras. **(B)** Gráfica del peso de los ratones durante el modelo de colitis. Los ratones WT, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se trataron con DSS 3% durante 5 días y se pesaron cada día. Los resultados representan media \pm SEM (n=5-9 ratones) **p \leq 0,01.

Para hacer un estudio histopatológico del colon, como se describe en el apartado 3.6.7. de materiales y métodos, los ratones WT, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se trataron con DSS y se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 0 días, como controles para el experimento; 5 días de tratamiento con DSS; 10 días, habiendo dado 5 días el DSS y permitiendo 5 días de recuperación a los ratones tras el tratamiento; y 15 días, lo que supone 10 días de recuperación tras el tratamiento (Fig R10A).

Lo primero que observamos es que a 5 días del tratamiento con DSS hay un incremento en la inflamación del colon y la aparición de úlceras en los 3

genotipos (Fig R11A-C). En condiciones basales, el grado de inflamación en los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ es menor que en los WT y los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$. A día 5 el grado de inflamación en WT es significativamente menor que en VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$. Esta diferencia no se observa con los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R11B). A día 10 los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan menor grado de inflamación frente a WT a este tiempo, y esa reducción en el grado de inflamación será mucho mayor y estadísticamente significativa frente a WT y VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ a día 15, los cuales presentan un grado de inflamación similar al alcanzado a día 5 (Fig R11B). Estos resultados son consistentes con los datos de peso mostrados anteriormente (Fig R10B).

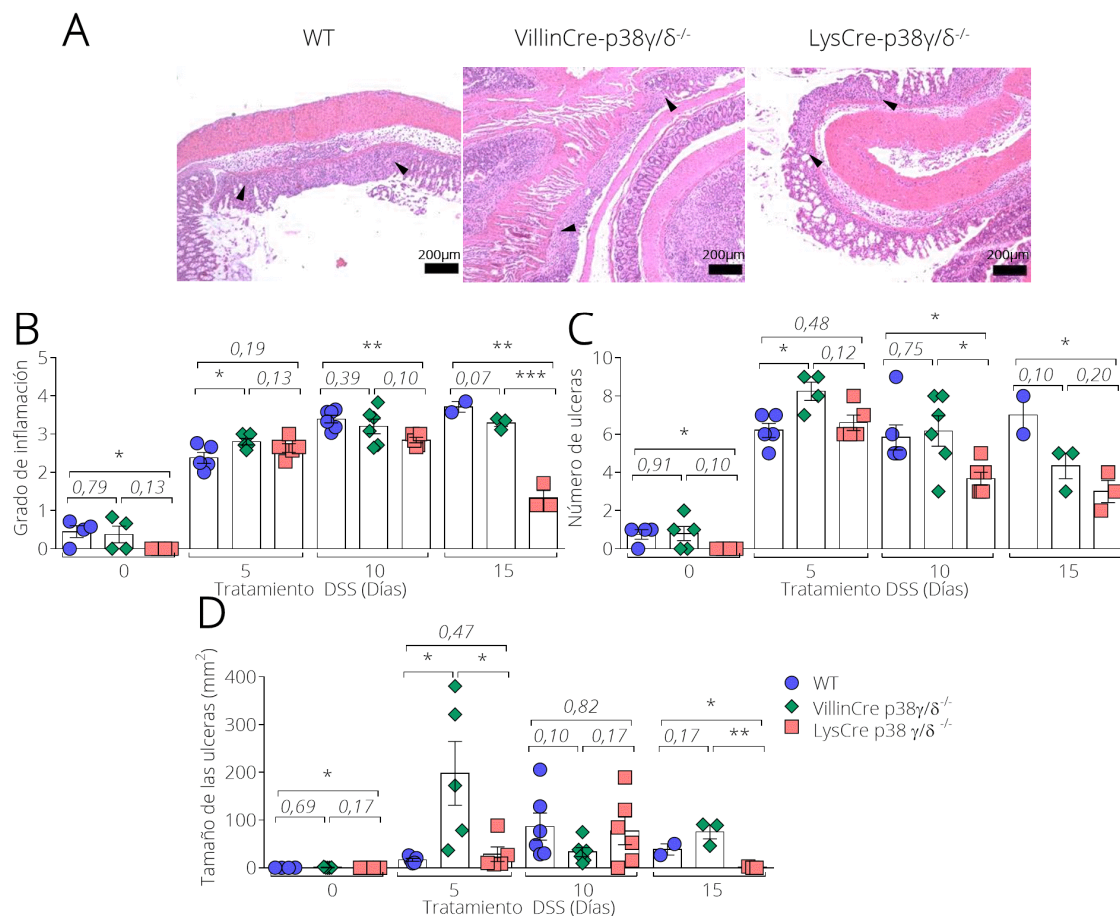


Fig R11. Los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan mayor índice de inflamación, más úlceras y de mayor tamaño que los WT y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$. Los ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ se trataron con DSS 3% (Fig R10A) para inducirles colitis y se tomaron muestras a los días: 0, 5, 10 y 15 (A) Fotografía representativa de úlceras generadas en los

ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ a día 5 de tratamiento con DSS. Las secciones de colon se tiñeron con H&E. Las flechas indican los puntos de inicio y final de las úlceras. **(B)** Grado de inflamación, **(C)** Número de úlceras generadas y **(D)** Tamaño de las mismas. Cada punto representa un ratón y Las barras representan la media \pm SEM (n=4-5 ratones). *p \leq 0,05;**p \leq 0,01.

Al contabilizar el número de úlceras en el epitelio de los 3 genotipos, observamos que a día 0 el epitelio de los WT y los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan algunas úlceras (Fig R11C). A día 5 aumenta el número de las úlceras presentes en el epitelio intestinal de los 3 genotipos aunque son los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ los que presentan mayor número de úlceras (Fig R11C). Los ratones WT alcanzan su máximo número de úlceras a este día y su número se mantiene a día 10 y a día 15 (Fig R11C). A diferencia de los WT, los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ alcanzan su máximo número de úlceras a día 5 y luego bajan a día 10 y día 15 (Fig R11C). La bajada en el número de úlceras del epitelio de los ratones KO condicionales es más pronunciada en el caso de los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, los cuales son los que presentan menor número de úlceras a día 10 y día 15 (Fig R11C).

Simultáneamente a cuantificar el número de las úlceras se midió el tamaño de las mismas. A día 5 del tratamiento observamos que el tamaño de las úlceras en el epitelio de los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ eran marcadamente mayores que las de los WT y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R11D). El tamaño de las úlceras de los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ tras alcanzar su máximo a día 5, se reducen enormemente a día 10 aunque aumentan ligeramente a día 15 (Fig R11D). Mientras tanto el tamaño de las úlceras de los WT y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ alcanzan su máximo tamaño a día 10 y se reducen a día 15 (Fig R11D). La reducción en el caso de los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ es tal que el tamaño de sus úlceras son mucho menores que las encontradas en WT y VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R11D).

Estos resultados indican que el epitelio intestinal de los ratones $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ es menos susceptible al daño que provoca el DSS y que por el contrario el epitelio de los $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ es más sensible. Además, la rápida recuperación que muestran los $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ en cuanto al número y el tamaño de las úlceras puede ser debido a un mecanismo de reparación más activo o eficaz.

2.2. La permeabilidad del epitelio intestinal en los $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ se incrementa en respuesta al tratamiento con DSS.

La mayor susceptibilidad del epitelio del colon de los ratones $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ al tratamiento con DSS indica que la permeabilidad del mismo puede estar afectada. La permeabilidad es un dato característico del estado del epitelio puesto que a mayor daño epitelial, menos eficaz será el efecto barrera y mayor será la permeabilidad. Para medir la permeabilidad del epitelio intestinal en los distintos grupos de ratones cuantificamos la cantidad de Dextrano-FITC que llegaba a la sangre, como se describe en la sección 3.9. de materiales y métodos, a días 0, 2,5 y 5 de tratamiento con DSS. A día 0 la permeabilidad es similar en los 3 genotipos. Sin embargo, observamos que a día 2,5 y día 5 del tratamiento, ésta es significativamente superior en los ratones $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ que en los WT y los $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R12). La permeabilidad en los ratones WT y $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ es similar a día 0 y a día 5 (Fig R12). Por último a día 5 la permeabilidad del epitelio de los ratones $\text{p38}\gamma/\delta^{-/-}$ (KO global) es similar a la del epitelio de los $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R12), lo que refuerza la idea de que la delección de $\text{p38}\gamma$ y $\text{p38}\delta$ en el epitelio intestinal supone una mayor susceptibilidad o predisposición al daño epitelial en respuesta al tratamiento con DSS.

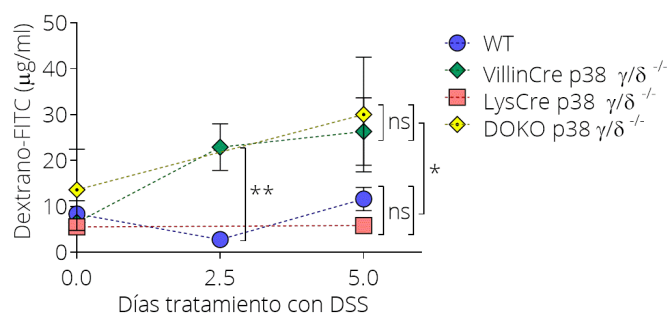


Fig R12. La permeabilidad del epitelio intestinal en los VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se incrementa en respuesta al tratamiento con DSS: Los ratones WT, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se trataron con DSS 3% para inducirles colitis. Para examinar la permeabilidad del epitelio intestinal tras el tratamiento, se les administra a los ratones una concentración de D-FITC (44 mg/ 100 g de peso) de forma oral y se calcula su concentración final en suero al cabo de 4 horas a partir de los valores de emisión de fluorescencia. Concentración de D-FITC en suero. Se representa la media \pm SEM (n=6-13 ratones). *p \leq 0,05;**p \leq 0,01.

A continuación analizamos si el aumento en la permeabilidad se debía a algún cambio en la composición proteica o en la estructura de las uniones, causada por la falta de p38 γ y p38 δ . Para ello estudiamos los niveles de expresión de E-cadherina y claudina-1, ambas proteínas importantes para el mantenimiento de la unión intercelular en el epitelio intestinal (Guttman and Finlay, 2009; Landy et al., 2016; Odenwald and Turner, 2016), mediante microscopía de fluorescencia (Fig R13A-B) y por western blot (Fig R13C). Aunque los resultados obtenidos por microscopía muestran que los niveles de expresión de E-cadherina en LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ son ligeramente menores que los de WT y los de VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R13A), en los resultados obtenidos por Western blot son similares en las tres líneas de ratón (Fig R13C). Por otro lado, Claudina-1 se expresa menos en los WT en comparación con VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig 12B). Otras proteínas importantes en las uniones intercelulares que forman parte de las TJ son ZO-1 y ocludina (Guttman and Finlay, 2009; Landy et al., 2016; Odenwald and Turner, 2016), por lo que analizamos los niveles de mRNA de ambas proteínas sin hallar ninguna diferencia (Fig R13D).

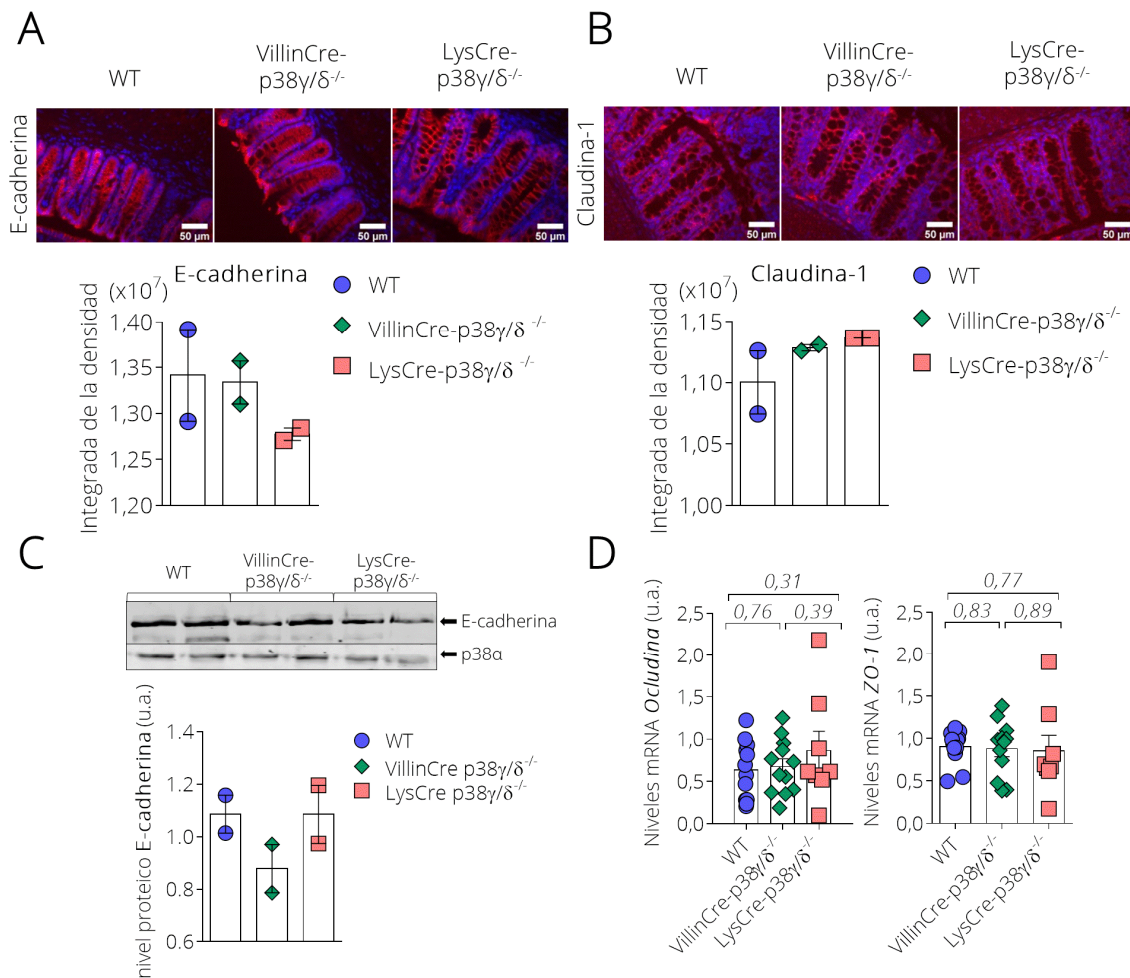


Fig R13. Análisis de la expresión de las proteínas de las uniones intercelulares en el epitelio intestinal: **(A)** Las secciones de colon de ratones sin tratar se tiñeron con anti-E-cadherina (rojo) y Hoechst (azul) para detectar la proteína y los núcleos, respectivamente, por microscopía de fluorescencia. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de la integral de la densidad de fluorescencia ($\times 10^7$) de 56-60 campos en un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=2 ratones). *** $p \leq 0,001$. **(B)** Las secciones se tiñeron con anti-Claudina-1 (rojo) y Hoechst (azul) para detectar la proteína y los núcleos, respectivamente, por microscopía de fluorescencia. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de la integral de la densidad de fluorescencia ($\times 10^7$) de 56-60 campos en un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=2 ratones). *** $p \leq 0,001$. **(C)** Las proteínas indicadas se inmunodetectaron en extractos de colon de ratones control. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la intensidad relativa de la proteína normalizada frente a p38 α y Las barras representan la media \pm SEM (n=2 ratones). **(D)** La expresión relativa de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR en el colon de

ratones y se normalizó frente a la expresión de mRNA de GAPDH. Cada punto representa a un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=9-12 ratones).

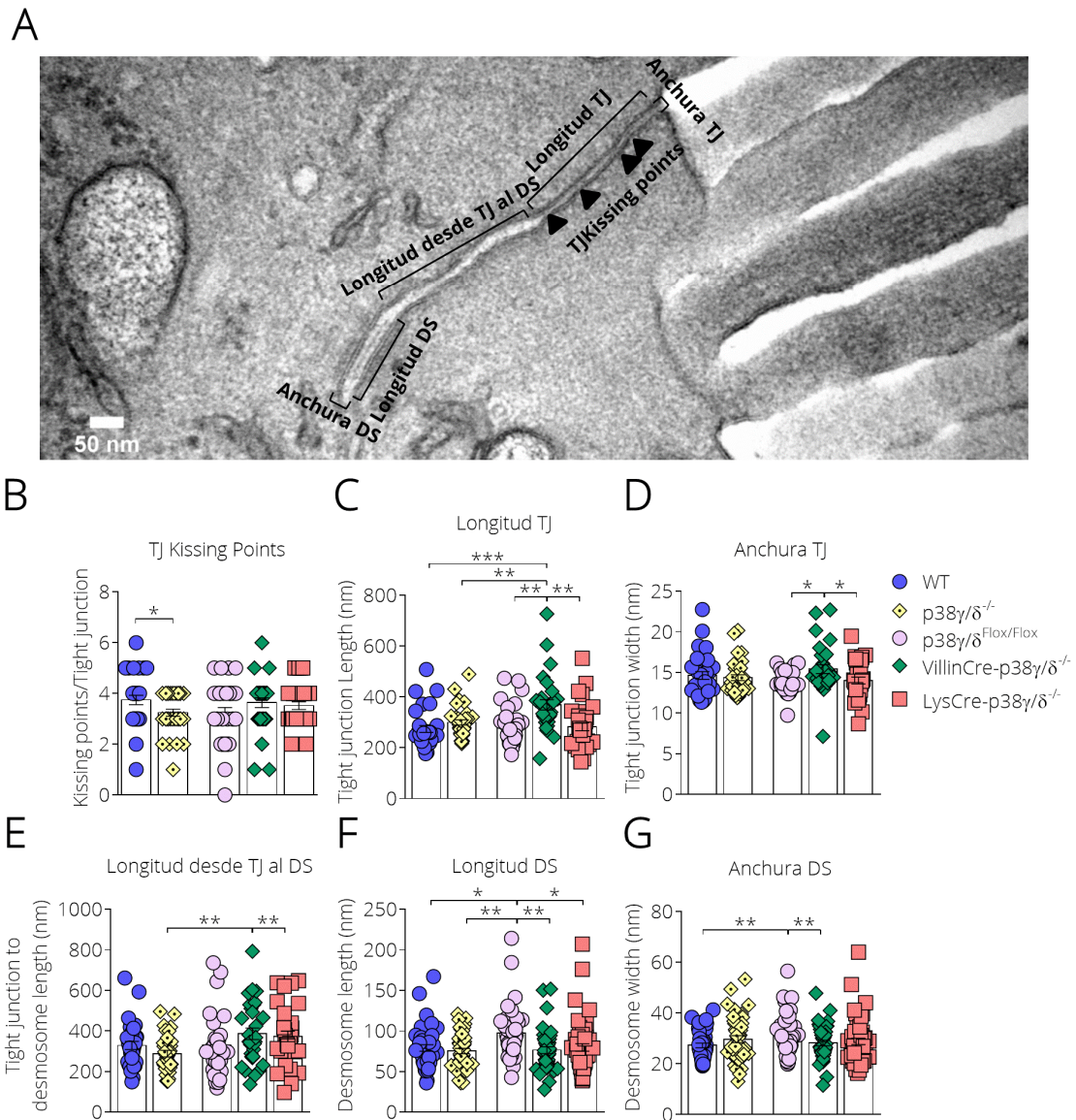


Fig R14. Análisis del estado de las uniones intercelulares del epitelio intestinal: El colon de los distintos ratones fue preparado por el servicio de microscopía electrónica del Centro Nacional de Biotecnología. **(A)** Imagen representativa con los distintos parámetros medidos. **(B)-(G)** Valores de los parámetros indicados. Cada punto representa la media de la cuantificación en 29-33 imágenes por genotipo. Se usó un ratón por genotipo. Las barras representan la media \pm SEM (n=29-33 campos). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

A continuación estudiamos el estado de las estructuras de unión intercelulares mediante microscopía electrónica. Para ello analizamos distintos parámetros: el número de puntos de unión (Kissing points (KP)), la longitud de las uniones estrechas (Tight junctions; TJ), la anchura de las TJ, la distancia entre el final de las TJ al primer desmosoma (DS), la longitud de los DS y la anchura de los DS (Fig R14A). Para el estudio empleamos los ratones WT, $p38\gamma/\delta^{Flox/Flox}$, VillinCre- $p38\gamma/\delta^{-/-}$, LysCre- $p38\gamma/\delta^{-/-}$, y $p38\gamma/\delta^{-/-}$. La razón de incluir los ratones $p38\gamma/\delta^{Flox/Flox}$ además de los WT en este caso era para asegurarnos de que no existía ninguna diferencia estructural entre ellos, a nivel de microscopía electrónica, de manera que descartáramos que las posibles diferencias que encontramos en los KO condicionales se debieran a la delección selectiva de $p38\gamma$ y $p38\delta$ y no a otras causas. Por otro lado incluimos también los ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$ como un control positivo de la delección de $p38\gamma$ y $p38\delta$ en todo el organismo del ratón. Los ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$ se comportaron como los WT en todos los parámetros analizados excepto en el número de KP, los ratones $p38\gamma/\delta^{-/-}$ presentaban menos puntos de unión (Fig R14B). En las uniones del ratón $p38\gamma/\delta^{Flox/Flox}$ encontramos que sus desmosomas eran ligeramente más largos que los del resto de ratones (Fig R14F). Respecto a los ratones KO condicionales, el ratón LysCre- $p38\gamma/\delta^{-/-}$ se comporta como el WT para todos los casos (Fig R14B-G) mientras que los ratones VillinCre- $p38\gamma/\delta^{-/-}$ tienen las TJ más largas, más anchas y la distancia entre el final de la TJ hasta el primer DS es mayor (Fig R14C, R14D, R14E). Estas diferencias que encontramos en el ratón VillinCre- $p38\gamma/\delta^{-/-}$ pudieran ser la causa de que sus uniones intercelulares sean más débiles y por tanto sean más susceptibles al daño causado por el DSS.

Un año después de obtener los resultados de permeabilidad, descritos previamente, quisimos estudiar en profundidad cuales eran los mecanismos

moleculares por los que p38 γ y p38 δ regulaban la permeabilidad del epitelio intestinal. Para ello quisimos comprobar que el efecto en el aumento de la permeabilidad de los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ era general y no específico del tratamiento con DSS, utilizando otro agente que dañara la barrera intestinal, como la radiación, y corroborar nuestros resultados iniciales. Desafortunadamente, cuando volvimos a realizar estos ensayos no encontramos el mismo efecto que habíamos estado observando hasta ese momento (Fig R15). En esta ocasión el incremento en la permeabilidad tras los distintos tratamientos fue similar en los ratones WT y el VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R15). Pensamos que la pérdida del efecto puede deberse a algún cambio en la microbiota de los animales, o a algún cambio en el ecosistema del animalario que se escapa a nuestro control, y que hoy seguimos desconociendo.

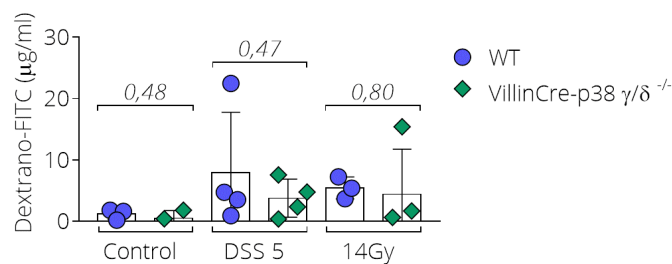


Fig R15. Comprobación del aumento de la permeabilidad en el epitelio intestinal de los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ en respuesta a otros tratamientos: Los ratones WT y VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se trataron con DSS 3% para inducirles colitis, o se les dio una dosis de radiación de 14Gy. Para examinar la permeabilidad del epitelio intestinal tras el tratamiento, se les administra a los ratones una concentración de D-FITC (44 mg/ 100 g de peso) de forma oral y se calcula su concentración final en suero al cabo de 4 horas a partir de los valores de emisión de fluorescencia. Concentración de D-FITC en suero de Los ratones WT y VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tratados con DSS3% durante 5 días, o con irradiación (14 Gy). Cada punto representa un ratón y Las barras representan la media \pm SEM (n=3-4 ratones).

2.3. Mecanismos celulares relacionados con el recambio y reparación del epitelio intestinal.

Los procesos de muerte y proliferación de las células del epitelio fueron otros parámetros que medimos para determinar la sensibilidad al tratamiento con DSS de los distintos genotipos. Analizando estos procesos podemos extrapolar la susceptibilidad al daño tisular y la recuperación del tejido tras el daño.

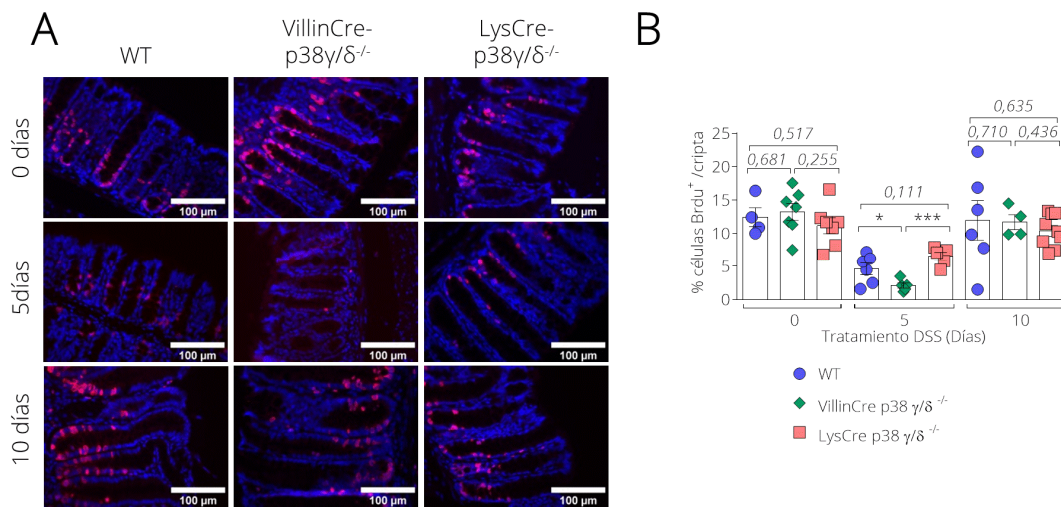


Fig R16 Proliferación celular en la base de las criptas de ratones WT, VillinCre-p38γ/δ^{-/-} y LysCre-p38γ/δ^{-/-} en respuesta al tratamiento con DSS: (A) Imágenes representativas de secciones de colon de ratones WT, VillinCre-p38γ/δ^{-/-} y LysCre-p38γ/δ^{-/-} tratados como se indica en la Fig. 9A y recogidas a día 0, 5 y 10. Las secciones se tiñeron con anti-BrdU (rojo) y Hoechst (azul) para detectar las células proliferativas y los núcleos, respectivamente, por microscopía de fluorescencia. **(B)** Porcentajes de células BrdU⁺ por cripta. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de las cuantificaciones de al menos 30 criptas por ratón. Las barras representan la media ± SEM (n=4-9). *p≤0,05;***p≤0,001.

Para medir la proliferación celular medimos la incorporación de BrdU (Fig R16A-B) como se describe en el apartado 3.6.4 de materiales y métodos. Grupos de ratones WT, VillinCre-p38γ/δ^{-/-} y LysCre-p38γ/δ^{-/-} fueron sometidos a tratamiento con DSS durante 5 días y otros 5 días de recuperación, como se describe en el apartado 2.3. de Materiales y métodos. Lo primero que

podemos observar es que en líneas generales la proliferación a día 5 del tratamiento en los 3 genotipos se reduce frente a los valores presentes en condiciones basales, y que posteriormente a día 10 se recuperan valores de proliferación cercanos a los de día 0 (Fig R16B). Solo encontramos diferencias entre los 3 genotipos a día 5, momento en el que la proliferación en el epitelio intestinal de los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ es mucho menor que la de los WT y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R16B). Los datos sobre la proliferación a día 10 coincidirían con la recuperación del epitelio que hemos descrito previamente mediante el estudio histopatológico.

El índice de muerte celular se determinó mediante el ensayo de TUNEL (Fig R17A-B) como se describe en el apartado 3.6.5 de materiales y métodos. En este caso observamos que los 3 genotipos parten de unos valores de muerte celular bajos que aumentan a los días 2,5 y 5 durante el tratamiento con DSS, y que luego se recuperan los niveles basales a día 10 (Fig R17B). Mientras que los 3 genotipos se comportan de manera similar a los días 0, 5 y 10, observamos que a día 2,5 la muerte celular en el epitelio intestinal de los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ es mayor que la de los WT y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R17B).

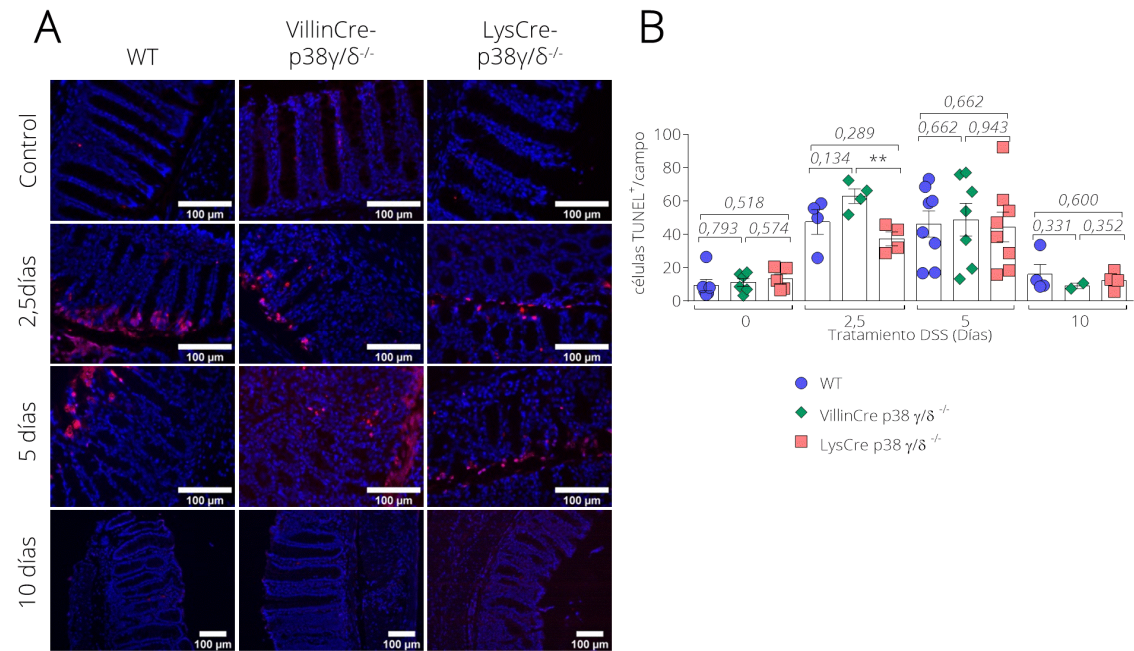


Fig R17. Muerte celular en las criptas de ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ en respuesta al tratamiento con DSS: (A) Imágenes representativas de secciones de colon de ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ tratados como se indica en la Fig. 9A y recogidas a día 0, 2,5, 5 y 10. Las secciones se tiñeron con TUNEL (rojo) y Hoechst (azul) para detectar las células apoptóticas y los núcleos, respectivamente, por microscopía de fluorescencia. (B) Porcentajes de células TUNEL⁺ detectadas por campo. Cada punto representa el valor obtenido en un ratón, que es la media de las cuantificaciones de al menos 20 campos. Las barras representan la media \pm SEM (n=2-8). **p \leq 0,01.

Lo datos sobre TUNEL corroborarían los resultados que tenemos sobre las úlceras puesto que la mayor apoptosis a día 2,5, de los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ sería la causa de que estos presenten más y mayores úlceras a día 5.

2.4. Análisis de las poblaciones del sistema inmune infiltradas en el colon a día 5 del tratamiento con DSS.

A continuación examinamos mediante citometría de flujo el grado de infiltración de distintas poblaciones del sistema inmune, línea mieloide y línea linfoide, en el epitelio del colon tras 5 días de tratamiento con DSS.

4.3. La infiltración de neutrófilos y macrófagos es mayor en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS.

Para analizar las principales poblaciones del sistema inmune innato en el colon de los animales tratados, primero seleccionamos las células positivas para el marcador de leucocitos CD45. A partir de esta población de células CD45⁺ identificamos distintas poblaciones mediante marcadores celulares específicos: Ly6G para neutrófilos, F4/80 para macrófagos y CD11c para células dendríticas (Fig R18A).

Cuando analizamos la población de neutrófilos ($CD45^+Ly6G^+$) y de macrófagos ($CD45^+/F4/80^+$) en el epitelio intestinal, observamos que ya en condiciones basales los ratones $LysCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$ presentan un mayor porcentaje comparado con los otros dos genotipos (Fig R18B, R18C). Después de los 5 días de tratamiento con DSS las poblaciones de neutrófilos y macrófagos aumentan significativamente en los 3 genotipos (Fig R18B, R18C). Seguimos observando que a los 5 días, los ratones $LysCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$ presentan un mayor de porcentaje de células $CD45^+Ly6G^+$ y $CD45^+F4/80^+$ que los WT y los $VillinCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R18B, R18C). Además, el porcentaje de neutrófilos presentes en los $VillinCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$, comparado con el de los WT y los $LysCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$, es significativamente menor, mientras que el de macrófagos es similar al WT pero menor que en $LysCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R18B, R18C). Por último observamos que el porcentaje de células dendríticas ($CD45^+CD11c^+$) aumenta muy ligeramente con el tratamiento y que no hay diferencias aparentes entre los 3 genotipos a ninguno de los tiempos analizados (Fig R18D).

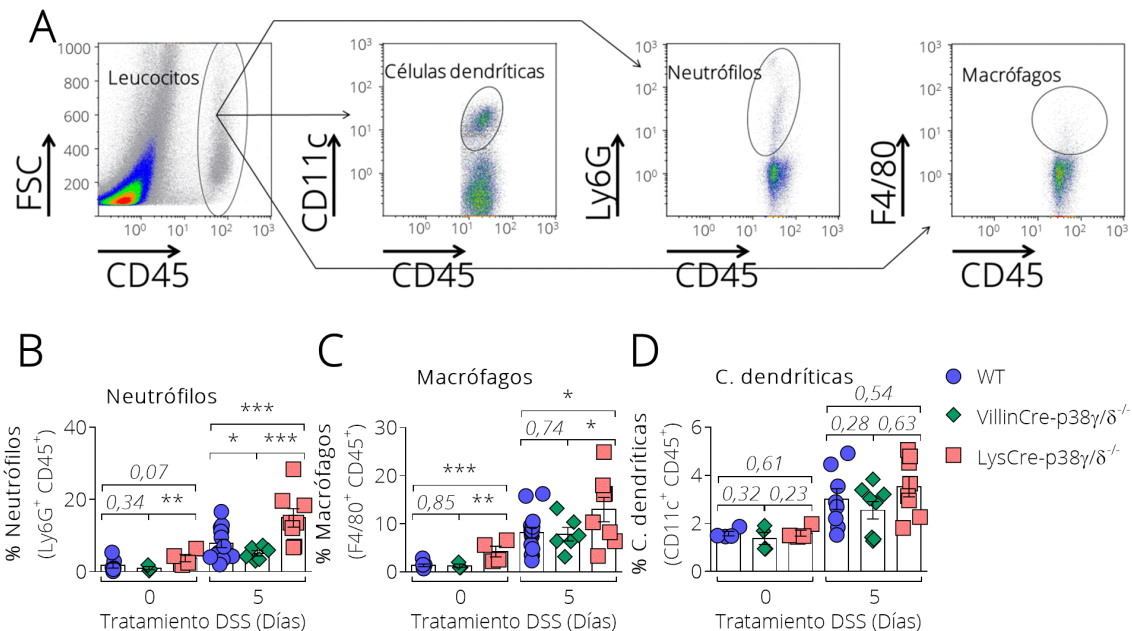


Fig R18. Análisis de las principales poblaciones de la línea mieloide en el colon tras el tratamiento con DSS: Los ratones WT, $VillinCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$ y $LysCre-p38\gamma/\delta^{-/-}$ se trataron con DSS

para inducir colitis. A los 5 días se recogieron los colones, se disgregaron las criptas y se identificaron mediante citometría de flujo las células infiltradas del sistema inmune conforme a los marcadores celulares indicados. **(A)** Panel representativo del marcaje y análisis realizados para cuantificar las distintas poblaciones de origen mieloide. **(B)-(D)** Porcentaje de las células indicadas en el colon de los ratones tratados con DSS. Cada punto representa a un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=3-14 ratones) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.4. El porcentaje de macrófagos M2 infiltrados es menor en los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS.

Debido a la importancia de los macrófagos tanto en los primeros estadios de la inflamación como en el posterior proceso de reparación del daño producido (Fernando O. Martinez and Gordon, 2014), decidimos analizar por citometría de flujo las distintas subpoblaciones de macrófagos a los 5 días del tratamiento. Para ello seleccionamos primero las células mieloides (CD11b⁺) y a partir de ellas diferenciamos las poblaciones de macrófagos M1 (CD11b⁺F4/80⁺Ly6C^{High}) y macrófagos M2 (CD11b⁺ F4/80⁺Ly6C^{Low}). A su vez los macrófagos M2 se pueden clasificar en distintos subtipos por lo que decidimos analizar cuáles de estos presentaban un fenotipo M2b (CD11b⁺ F4/80⁺Ly6C^{High} MHCII^{High}), más asociados a la inmunoregulación, o un fenotipo M2c (CD11b⁺ F4/80⁺Ly6C^{High} MHCII^{Low}), más asociados a los procesos de remodelación y curación del tejido (Fig R19A).

Los resultados no muestran ninguna diferencia en la distribución de los M1 entre los 3 genotipos (Fig R19B). Al analizar la distribución porcentual de los macrófagos M2, estos son menores en los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ respecto a los WT y los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R19C). Por último no encontramos diferencias en la distribución de los macrófagos M2b entre los 3 genotipos (Fig

R19D), pero el porcentaje de M2c son menores en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ que en los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$.

Además de las distintas subpoblaciones de macrófagos, analizamos los eosinófilos definidos como células CD11b⁺SiglecF⁺ (Fig R19A) pero no encontramos ninguna diferencia entre los 3 casos (Fig R19F).

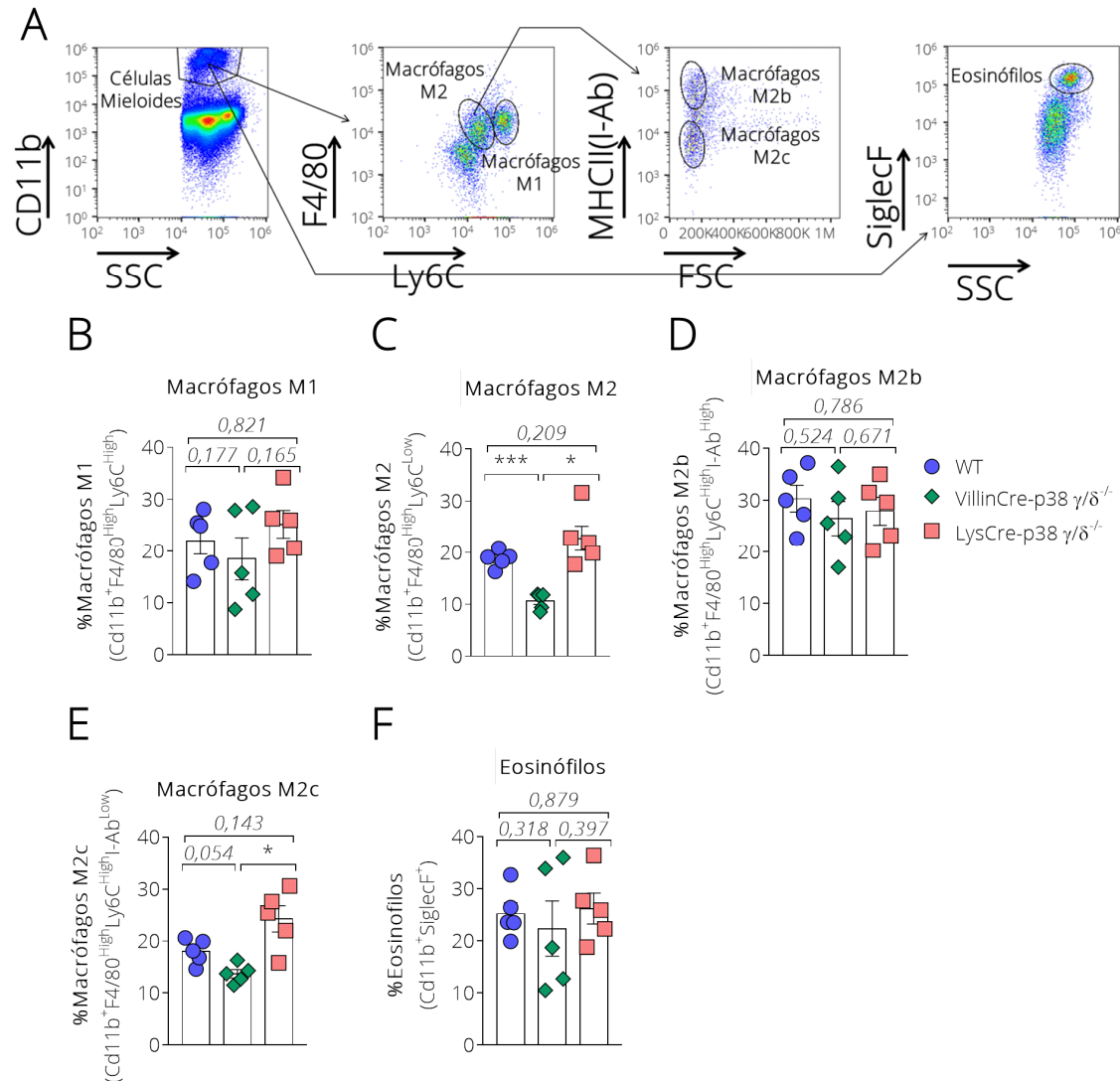


Fig R19. Análisis de las subpoblaciones de origen mieloide en el colon tras el tratamiento con DSS: Los ratones WT, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se trataron con DSS para inducir colitis. A los 5 días se recogieron los colones, se disgregaron las criptas y se identificaron mediante citometría de flujo las células infiltradas del sistema inmune conforme a los marcadores celulares indicados. **(A)** Panel representativo del marcaje y análisis realizados para cuantificar las distintas poblaciones de origen mieloide. **(B)-(G)** Porcentaje de las células

indicadas en el colon de los ratones tratados con DSS. Cada punto representa a un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=5 ratones) *p \leq 0,05;**p \leq 0,01;*** p \leq 0,001.

Que los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ presenten un menor porcentaje de macrófagos M2c que los WT y los LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$, puede suponer una menor inducción de los procesos de regeneración del tejido y concuerdan con los resultados observados a día 5 en la proliferación (Fig R16B) y las úlceras (Fig R11C-D).

4.5. Los ratones LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ presentan más IELs CD4⁺ y menos IELs CD8⁺ que los ratones WT y los VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$.

Además de las distintas poblaciones mieloides, analizamos las distintas poblaciones linfoides en el colon de los animales tratados con DSS. Para ello primero seleccionamos las células CD45⁺ y a partir de ellas analizamos las distintas subpoblaciones de los linfocitos intraepiteliales (IELs) intestinales en función de marcadores celulares específicos: TCR $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, CD4⁺ y CD8⁺ y NK1.1⁺ (Cheroutre et al., 2011; Kumar et al., 2017) (Fig R20A). Además identificamos los linfocitos B a partir del marcador de superficie B220 (Fig R20A) y los Linfocitos T reguladores (Treg) a partir de la subpoblación CD127^{low} que presentaba el marcador CD4 (Fig R20A).

El primer análisis que realizamos de los IEL fue en función de la expresión del tipo de receptor TCR que expresan ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$). No encontramos ninguna diferencia entre las poblaciones TCR $\gamma\delta$ ⁺ entre los ratones knockouts y el WT ni a tiempo 0 ni en respuesta al tratamiento (Fig R20C). Sin embargo, si encontramos diferencias significativas en la población TCR $\alpha\beta$ ⁺ a día 0 y tras los 5 días con DSS. La frecuencia de IELs TCR $\alpha\beta$ ⁺ es menor en los ratones VillinCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38y/ $\delta^{-/-}$ que en los WT (Fig R20B). Además los

ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan menor porcentaje de IELs TCR $\alpha\beta^{+}$ que los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R20B). Analizamos también cuales eran las frecuencias de los IELs CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ (Fig R20D, R20E). Ya en condiciones basales el genotipo LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presenta un mayor porcentaje de IELs CD4 $^{+}$ que el WT y el VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, y su frecuencia se incrementa en respuesta al tratamiento (Fig R20D). El aumento de los CD4 $^{+}$ en WT y VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ en respuesta al tratamiento comparado con sus condiciones basales es pequeño, sobre todo en el caso de los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, pero en ninguna de las condiciones llega a existir una diferencia significativa entre ambos genotipos (Fig R20D). De forma opuesta a como ocurre con los IELs CD4 $^{+}$, el porcentaje de IELs CD8 $^{+}$ de los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con DSS, es menor respecto al WT y al VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, entre los cuales no existe ninguna diferencia (Fig R20E). También observamos que no hay variación en las frecuencias de IELs CD8 $^{+}$ tras el tratamiento en ninguno de los genotipos (Fig R20E). También analizamos la subpoblación de células ILC1-like que no expresan TCR y adoptan funciones citotóxicas similares a las NK, las células NK1.1 $^{+}$. Las frecuencias de las células NK1.1 $^{+}$ en condiciones basales son muy bajas (Fig R20F). Tras el tratamiento con DSS se produce un aumento en el porcentaje de esta subpoblación de ILCs. Este incremento es mayor en los LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, aunque la diferencia solo es significativa con respecto a los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, pero no respecto a los WT, probablemente debido al bajo número de ratones utilizados en este análisis (Fig R20F).

Cuando analizamos los porcentajes de las células Treg (CD127 $^{\text{low}}$ CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$) no encontramos ninguna diferencia entre los 3 genotipos, ni a día 0 ni a día 5, ni observamos que los porcentajes aumenten en respuesta al tratamiento ni en WT, ni en VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, ni en LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R20G).

Los ratones WT son los que presentan menor porcentaje de Linfocitos B ($B220^+$) en comparación a ambos mutantes. Las frecuencias de Linfocitos B descienden ligeramente tras los 5 días con DSS en los 3 genotipos, y aunque la diferencia entre WT con VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se reduce, sigue siendo significativa (Fig R20H).

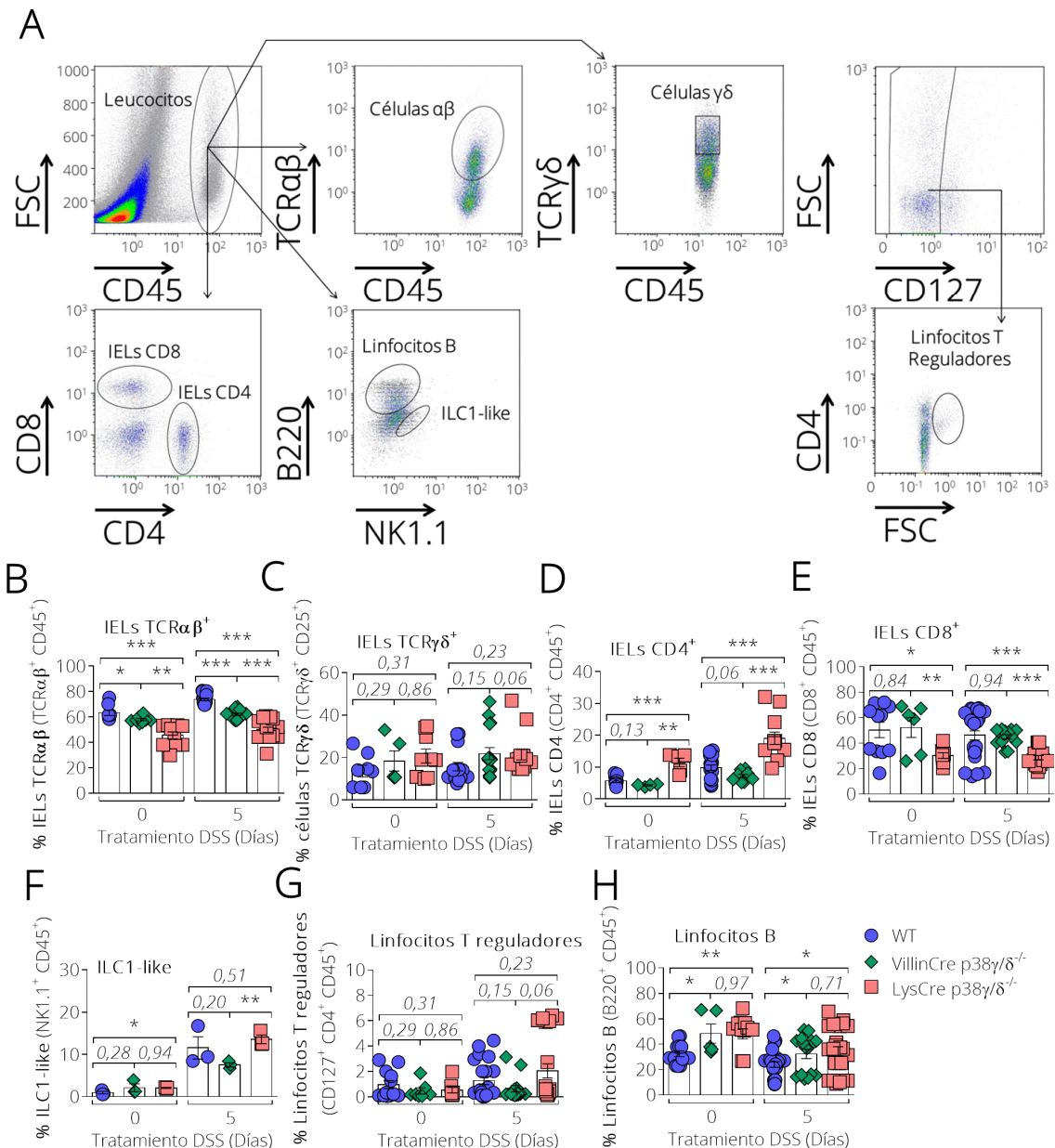


Fig R20. Análisis de las poblaciones de linfocitos intraepiteliales (IELs) en el colon tras el tratamiento con DSS: Los ratones WT, VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ se trataron con DSS para inducir colitis. A los 5 días se recogieron los colones, se disgregaron las criptas y se identificaron mediante citometría de flujo las distintas subpoblaciones de linfocitos conforme a los marcadores celulares indicados. (A) Panel representativo del marcaje y análisis realizados

para cuantificar las distintas poblaciones de IELs, de linfocitos B y linfocitos T reguladores. **(B)**- **(H)** Porcentaje de las células indicadas en el colon de los ratones tratados con DSS. Cada punto representa a un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=3-27 ratones) *p \leq 0,05;**p \leq 0,01;*** p \leq 0,001.

Estos resultados muestran que existe un desequilibrio en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ respecto a las poblaciones de IELs CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ comparado con los ratones WT y VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$.

2.5. Niveles de expresión de mRNA de diversos genes relacionados con el desarrollo de la UC.

A continuación analizamos los niveles de expresión de los mRNAs de los genes para distintas proteínas que participan en la regulación de procesos pro- y anti-inflamatorios (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *COX2*, *IL-18*, *IL-17A*, *IL-17F*, *IL-10*, *IL-11*, *IFN β* , *IFN γ* , *IL-13*), del reclutamiento de células del sistema inmune (*KC*, *MCP-1*, *MIP-2*, *CXCL10*, *CCL25*, *CCL9*, *CCL5*, *CCL3*) u otras proteínas que participan de procesos relacionados con la UC (*CCND1*, *c-Myc*). Para comparar las diferencias entre los 3 genotipos tomamos muestras totales de colon a día 0 y a día 6, un día después de finalizar el tratamiento con DSS (Fig R21).

Observamos que la expresión de *IL-1 β* , *IL-6* y *TNF α* , citoquinas clásicamente asociadas a los procesos inflamatorios, se encuentra inducida en respuesta al tratamiento en los 3 genotipos, aunque la inducción de *TNF α* es menor en comparación con las otras dos (Fig R21A-C). Tras el tratamiento con DSS la inducción del mRNA de *IL-1 β* e *IL-6* en los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ es mayor respecto a WT y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R21A-B), mientras que no observamos diferencias en los niveles de *TNF α* entre los distintos genotipos (Fig R21C). Los valores basales para *TNF α* son mayores en VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ respecto a los

otros dos genotipos (Fig R21C). *COX2*, al igual que sucede con *TNF α* , tiene muy poca inducción en respuesta al tratamiento y solo encontramos diferencias en el estado basal, en este caso son los ratones *LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* los que presentan un valor más bajo respecto a los WT y *VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* (Fig R21D). *IL-18*, a diferencia de todos los anteriores, sufre una reducción con el tratamiento (Fig R21E). No encontramos diferencias entre los 3 genotipos tras los 6 días pero los valores de *IL-18* para *LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* a nivel basal son significativamente mayores que en WT (Fig R21E). *IL-17A*, *IL-17F*, *IL-11* e *IFN β* se inducen en respuesta al tratamiento pero no encontramos ninguna diferencia entre los 3 genotipos ni en estado basal ni tras el tratamiento (Fig R21F, R21G, R21I, R21J). Los niveles de *IFN γ* no se alteran con el tratamiento y tampoco muestran diferencias entre los genotipos (Fig R21K). En el caso de *IL-10* observamos que se induce su expresión en los ratones *VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* en respuesta al tratamiento, mientras que los WT y los *LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* siguen presentando valores similares a los basales (Fig R21H). Los valores de *IL-13* se reducen en respuesta al tratamiento manteniendo el mismo perfil en estado basal o tras el tratamiento, siendo menores los valores para el *LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* respecto a los otros 2 genotipos (Fig R21L).

La expresión de todas las quimioquinas se induce en respuesta al tratamiento con DSS a excepción de *CCL25* y *CCL5* (Fig R21Q, R21S). En general no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los 3 genotipos tras el tratamiento. Solo para el caso de la quimioquina *CXCL10* encontramos diferencias, siendo mayor la inducción para el caso de los *LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* en comparación con WT (estadísticamente significativa) y *VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* (Fig R21P). Si nos centramos en los valores basales, observamos que *LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$* presenta niveles de mRNA significativamente

más altos para las quimioquinas *KC* y *CCL9*, respecto a WT y VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R21M, R21R).

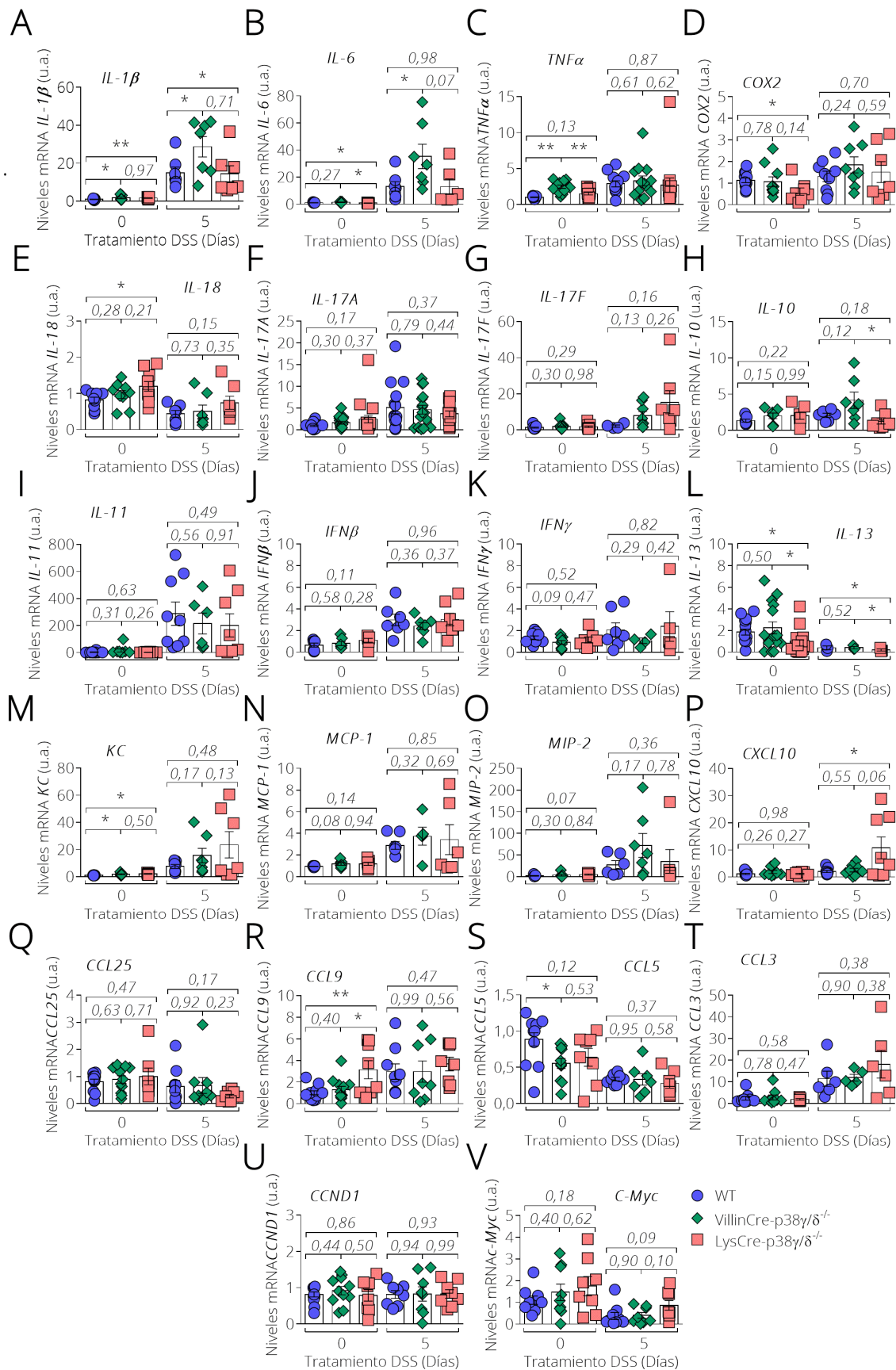


Fig R21. Niveles de expresión de mRNA de diversas proteínas relacionadas con la colitis: La expresión relativa de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR en el colon de ratones tratados con DSS 3% más 1 día de recuperación con agua, y se normalizó frente a la expresión de mRNA de GAPDH. Cada punto representa a un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=9-19 ratones). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Por último miramos los niveles de expresión del mRNA de *CCND1* y *c-Myc*, proteínas implicadas en procesos proliferativos e identificadas como posibles proto-oncogenes. Mientras que para *CCND1* no encontramos ningún cambio entre las condiciones basales y tras el tratamiento para los 3 genotipos (Fig R21T), Los niveles de *c-Myc* se reducen en respuesta al tratamiento por igual en todos los ratones (Fig R21U), lo que concuerda con los datos sobre proliferación que habíamos obtenido anteriormente (Fig R21B)

Los resultados indican que los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan mayores niveles de algunas citoquinas que los ratones WT y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ incluso en estado basal. Así mismo los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ presentan mayores niveles de algunas quimioquinas.

2.6. Análisis de la expresión de proteínas implicadas en inflamación tras el tratamiento con DSS.

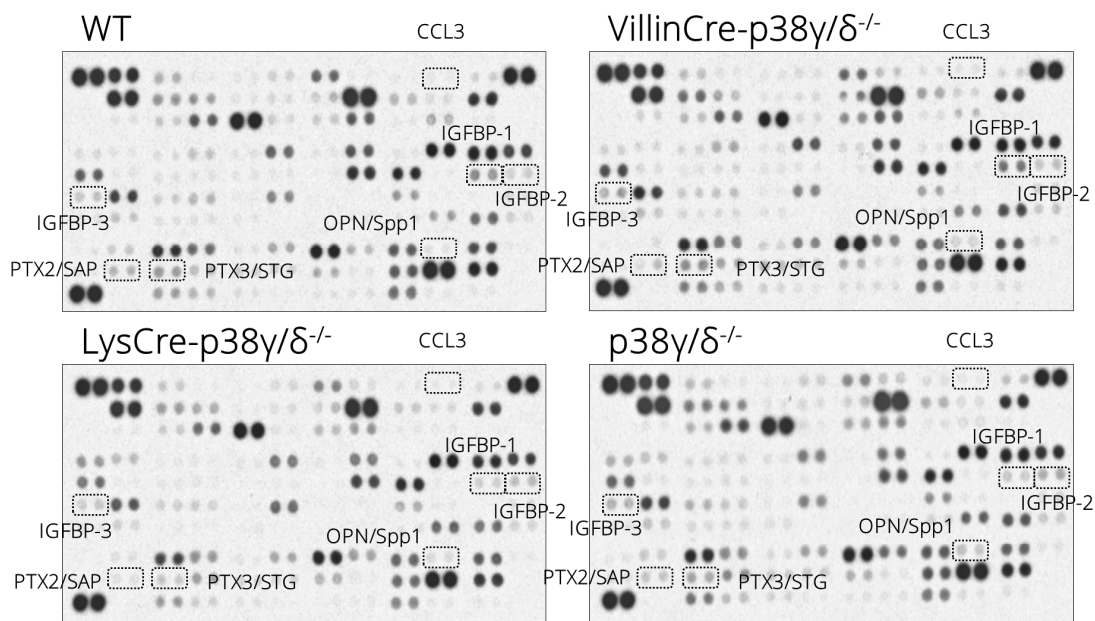
Para analizar directamente los niveles de diferentes proteínas tras el tratamiento con DSS usamos un array (proteome profiler mouse XL cytokine array) que nos permitía detectar hasta 111 citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento (Fig R22). El análisis lo realizamos en 4 líneas de ratón diferentes: WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y p38 γ / $\delta^{-/-}$ (como control) como se indica en la sección 2.1. de materiales y métodos (Fig R22). Tras la cuantificación de la intensidad de cada señal, como se describe en el apartado

3.8. de materiales y métodos, calculamos la relación de cada una de las intensidades obtenidas para las 3 líneas knockout con respecto a WT. Seleccionamos aquellas proteínas cuya relación frente a WT era mayor de 1,5 o menores de 0,5 tras el tratamiento con DSS (Fig R22B) como posibles candidatas para estudiar si p38 γ y p38 δ estaban regulándolas a nivel transcripcional.

De la lista de posibles candidatos, destacaban las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 (Fig R22B), que muestran unos niveles de expresión muy elevados en LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Esto concuerda con el dato obtenido por qPCR para CXCL10 (Fig R21P). Otra familia de proteínas que aparecían como candidatas eran las IGFBP-1 e IGFBP-3, proteínas encargadas de unirse al factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) para facilitar su transporte, del cual recientemente se ha descrito que promueve la generación de CAC a través de p38 α (Youssif et al., 2018). Tras el tratamiento con DSS la expresión de IGFBP-1 es menor en el colon de los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ que en el de los WT y los VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R22B), que presentan niveles de expresión similares. La expresión de IGFBP-3 tras el tratamiento con DSS es mayor en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ comparados con los WT y los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R22B), que presentan niveles similares. También fueron candidatas pentraxina 2/SAP (PTX2/SAP) y pentraxina 3/STG (PTX3/STG), que son una clase de receptores de reconocimiento de patrones. Los niveles de expresión de PTX2 tras el tratamiento con DSS son menores en VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ respecto a WT, sobre todo en el caso de los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R22B). La expresión de PTX3 tras el tratamiento con DSS se reduce en los LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y los p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ respecto a WT y VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Fig R22B). Por último, otra de las proteínas que más destacaba era la osteopontina/SPP1, la cual está muy relacionada con el desarrollo de la UC y

del CAC (Agrawal et al., 2003; Kanayama et al., 2017; Toyonaga et al., 2015; Wu et al., 2014). La expresión de la osteopontina en el colon de los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y p38 γ / $\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS es mucho mayor que la de los WT (Fig R22B). Para validar estos datos, decidimos analizar los niveles de mRNA en los ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ de IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, pentraxina 2/SAP, pentraxina 3/STG y osteopontina/SPP1 (Fig R23).

A



B

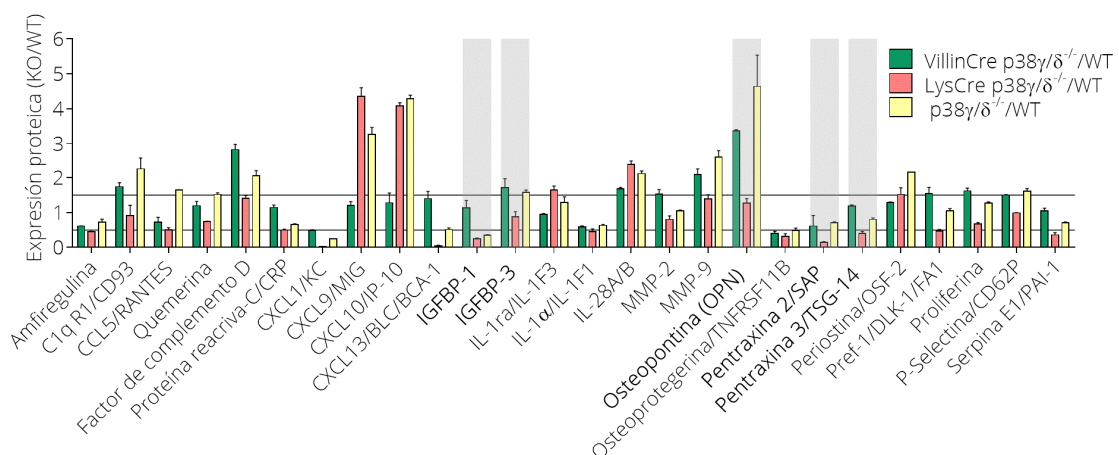


Fig R22. Niveles de expresión de proteínas tras el tratamiento con DSS: (A) Arrays de proteínas analizados para los ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y p38 γ / $\delta^{-/-}$ juntando el extracto de colon total de 6 ratones por genotipo, tratados con DSS durante 5 días más 1 día

de recuperación con agua. Las proteínas recuadradas fueron las seleccionadas para un posterior análisis. **(B)** Cuantificación de los arrays. Las unidades hacen referencia al ratio de expresión de las proteínas indicadas en cada uno de los ratones respecto a la expresión de la misma proteína en WT. Las proteínas representadas son aquellas en las que al menos uno de los genotipos presentaba un ratio $> 1,5$ o $< 0,5$. Las barras representan la media \pm SEM (n=2 medidas).

Cuando analizamos la expresión del mRNA de *IGFBP-1* observamos que los ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ no presentan diferencias a nivel basal y que tras el tratamiento con DSS su expresión aumenta en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ siendo significativamente mayores que en WT (Fig R23A). IGBFP-2, no era candidata para la lista, pero decidimos analizar sus niveles de mRNA al ser miembro de la familia de IGFBP-1 e IGFBP-3. Los niveles basales del mRNA de *IGFBP-2* en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ son mayores que los de WT y los de VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R23B), y aunque se reducen con el tratamiento en los 3 genotipos se sigue manteniendo la diferencia estadística significativamente entre LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y WT (Fig R23B). Cuando analizamos la expresión del mRNA de *IGFBP-3* no observamos ninguna diferencia entre los 3 genotipos ni entre los niveles basales o tras el tratamiento con DSS, aunque parece reducirse para los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R23C). El nivel de mRNA de *PTX2* basal es muy pequeño en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ comparados con los WT y los VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ (Fig R23D), y tras el tratamiento con DSS se reduce la expresión en los 3 genotipos hasta no haber ninguna diferencia entre ellos (Fig R23D). A nivel basal no existe ninguna diferencia en los niveles de mRNA de *PTX3*, pero estos aumentan tras el tratamiento con DSS en los 3 genotipos y su inducción es significativamente mayor en los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ respecto a los WT (Fig R23E). Los niveles basales de mRNA de la *osteopontina* en el colon de ratones WT, VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ son similares y tras el

tratamiento aumentan en WT y en VillinCre-p38 γ / δ ^{-/-} mientras que en LysCre-p38 γ / δ ^{-/-} no se modifican, siendo estadísticamente significativa la diferencia respecto a WT (Fig R23F).

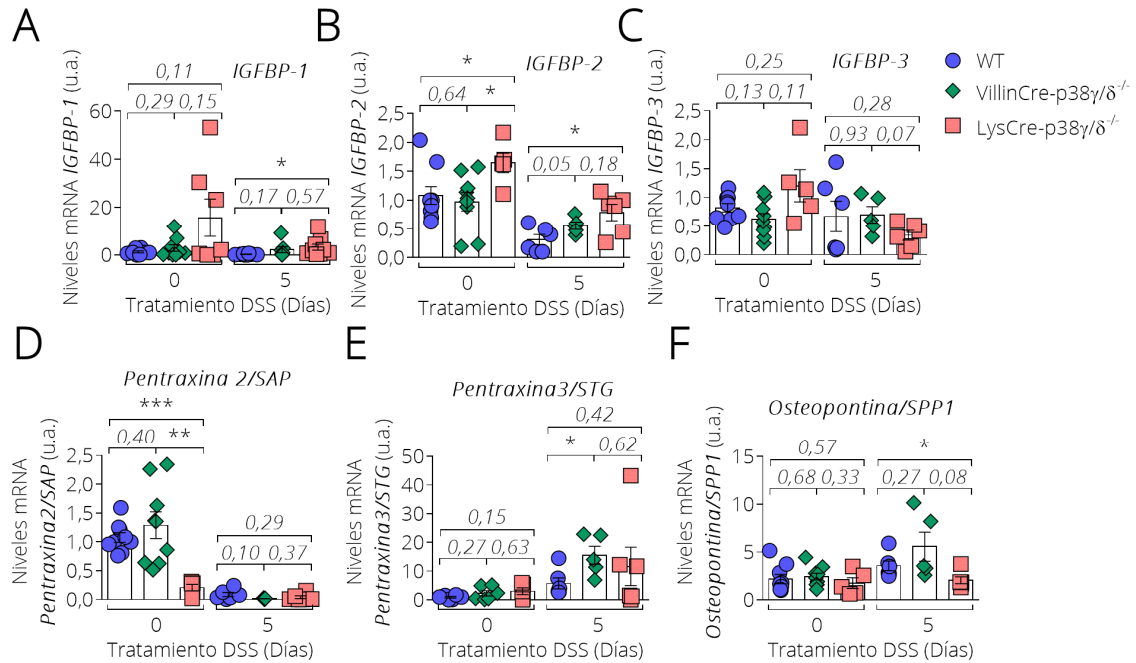


Fig R23. Niveles de expresión de mRNA de diversas proteínas relacionadas con la colitis: La expresión relativa de mRNA de los genes indicados se determinó por qPCR en el colon de ratones tratados con DSS 3% más 1 día de recuperación con agua, y se normalizó frente a la expresión de mRNA de GAPDH. Cada punto representa a un ratón. Las barras representan la media \pm SEM (n=5-9 ratones). *p<0,05; **p<0,01.

Estos resultados indican que las únicas proteínas para las que existe una correlación entre los cambios en los niveles del mRNA, y los cambios en los niveles de proteína, son CXCL10 y la osteopontina y solo en LysCre-p38 γ / δ ^{-/-}.

Discusión

Discusión.

Como hemos indicado previamente, la intrínseca relación entre la inflamación y el cáncer es un hecho ampliamente establecido (Balkwill and Mantovani, 2001; Grivennikov et al., 2010). También está descrito que las p38 γ y p38 δ MAPKs influyen en la iniciación y la progresión tumoral, y que el papel que desempeñan en esos procesos depende del contexto celular en el que se encuentren (Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017). Durante el desarrollo de esta tesis hemos comparado el papel de las isoformas p38 γ y p38 δ en los procesos de inflamación y transformación celular que se dan en el CAC, en función de dos contextos celulares tan diferentes como son el epitelio intestinal y la línea celular mieloide.

1.1. p38 γ y p38 δ regulan negativamente la tumorigénesis en el epitelio intestinal y positivamente en la línea mieloide.

En uno de los trabajos previos del grupo se mostró que los ratones p38 γ ^{-/-} o p38 δ ^{-/-} tratados con AOM/DSS presentaban menos tumores que los ratones WT sometidos al mismo tratamiento, y que este efecto era más pronunciado en ratones p38 γ / δ ^{-/-} (Del Reino et al., 2014). Incluso el tamaño de los tumores en los ratones p38 γ ^{-/-} y p38 γ / δ ^{-/-} es más reducido que el de los ratones WT (Del Reino et al., 2014). En esta tesis hemos descrito cómo la delección selectiva de p38 γ y p38 δ en las células de la línea mieloide reduce el número y el tamaño de los tumores en ratones tratados con AOM/DSS de manera similar al anterior trabajo publicado (Del Reino et al., 2014) mientras que la delección de p38 γ y p38 δ en las células del epitelio intestinal provoca el efecto opuesto, generando más tumores y de mayor tamaño, concordando con un aumento en la proliferación de las células tumorales. Estos resultados están en

consonancia con la severidad en la patología que muestran los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, tal y como refleja la curva de peso corporal a lo largo del tratamiento, mientras que la sintomatología es más leve en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$. Un efecto similar ha sido descrito en ratones en los que se ha delecionado selectivamente p38 α en epitelio intestinal o en la línea mieloide, promoviendo el CAC en el caso de la deleción en el epitelio intestinal, y disminuyendo el CAC para el caso de la línea mieloide (Gupta et al., 2014; Youssif et al., 2018).

También hemos descrito cómo la deleción de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide supone un aumento en la apoptosis de las células neoplásicas que conforman el tumor a los 80 días de tratamiento. Nuestros resultados indican que la eliminación de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide dificulta el desarrollo del CAC, posiblemente debido a una mejor acción antitumoral de las células T. Ya que las principales células implicadas en la muerte de las células neoplásicas son los linfocitos T CD8 (Grivennikov et al., 2010), el aumento en la apoptosis de las células tumorales que observamos en los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, puede estar relacionado con el sistema inmune adaptativo de una manera directa o indirecta.

1.2. La eliminación de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal supone un mayor reclutamiento de M-MDSC que podría causar una mayor inmunosupresión del sistema inmune adaptativo.

Los linfocitos T CD8⁺ son una de las principales células efectoras en las que se basa el organismo para la lucha contra las células neoplásicas. En la defensa antitumoral que desempeñan los linfocitos T CD8⁺, participan a su vez los linfocitos T CD4⁺, que a través de la producción y secreción de IFN γ ,

promueven la activación de linfocitos T CD8⁺ y células NK. Sin embargo, y tal como ya hemos comentado previamente, las distintas poblaciones de linfocitos T, entre las que encontramos los linfocitos citotóxicos, los linfocitos cooperantes y los linfocitos reguladores, pueden contribuir tanto a la defensa frente al tumor como a la tumorigénesis (Grivennikov et al., 2010; Waldner and Neurath, 2009). Por otro lado, también hemos citado previamente el papel que juegan las MDSC en la evasión de los mecanismos de defensa por parte de los tumores, mediante la inhibición directa o indirecta de los linfocitos T CD8⁺ (Gabrilovich and Nagaraj Bharadwaj, 2009; Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009), siendo más pronunciado el efecto inmunosupresor que ejercen las M-MDSC (Dolcetti et al., 2009; Cuenca et al., 2010; Haverkamp et al., 2011, 2014; De Sanctis et al., 2016).

Nuestros resultados muestran que los ratones VillinCre-p38γ/δ^{-/-} presentan un mayor porcentaje de M-MDSC en los tumores respecto a los WT y los LysCre-p38γ/δ^{-/-}. La eliminación de p38γ y p38δ en el epitelio intestinal promueve el reclutamiento de M-MDSC a los tumores, lo cual estaría ejerciendo un efecto inmunosupresor sobre los linfocitos citotóxicos permitiendo a las células neoplásicas evadir el sistema inmune adaptativo. De esta forma, al encontrarse inmunosuprimidos los linfocitos T CD8⁺, la patología es más severa y la tumorigénesis es mayor, nuestros resultados indican que esto podría estar pasando en los ratones VillinCre-p38γ/δ^{-/-}.

En el caso de los ratones LysCre-p38γ/δ^{-/-} respecto a los ratones WT no observamos diferencias que justifiquen de manera directa la mayor acción anti-tumoral (aumento de apoptosis) que hemos descrito. Por un lado podría ser que el mayor reclutamiento de linfocitos T CD4⁺ que observamos, esté aumentando las capacidades anti-tumorales de los linfocitos T CD8⁺. También

podría ser que la delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide regule negativamente la acción inmunosupresora que ejercen las MDSC sobre el sistema inmune adaptativo. Para confirmar si alguna de estas hipótesis es correcta, o lo son ambas, es necesario llevar a cabo ensayos de funcionalidad de los linfocitos T en cocultivo con las MDSC obtenidos de estos ratones.

1.3. La regulación que ejercen p38 γ y p38 δ en la producción de citoquinas depende del contexto celular en que se encuentren.

Aunque en estudios previos ya habíamos descrito cómo p38 γ y p38 δ regulan la vía de señalización de producción de citoquinas (Risco et al., 2012), y más en concreto en el modelo de CAC que estamos estudiando (Del Reino et al., 2014), en esta tesis hemos descrito cómo dicha regulación depende a su vez del compartimento celular en que se encuentren.

La delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal supone una mayor inducción de la citoquina *IL-1 β* en los tumores de CAC. Estos resultados concuerdan con la peor prognosis en el desarrollo de CAC que muestran los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, puesto que esta citoquina favorece la creación de un ambiente tumorigénico y la acumulación de mutaciones (Colotta et al., 2009; Hussain et al., 2003). En un estudio publicado, los autores describen cómo la delección de p38 γ en el epitelio intestinal suponía una menor inducción de la citoquina *IL-1 β* en los tumores desarrollados en CAC (Yin et al., 2016). Teniendo en cuenta ambos resultados, esto indicaría que es p38 δ en el epitelio intestinal la que está regulando la producción de *IL-1 β* .

También hemos descrito que la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal supone una menor inducción de la citoquina *IL-10* en los tumores de

CAC. Esta citoquina participa del reclutamiento de las MDSC al microambiente tumoral (Safarzadeh et al., 2018), y a su vez es secretada por parte de las MDSC para la inhibición del sistema inmune adaptativo (Elinav et al., 2013; Pan et al., 2010; Safarzadeh et al., 2018). Nuestros resultados muestran una menor inducción de *IL-10* en los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, lo que podría contradecir los resultados obtenidos en cuanto al reclutamiento de las MDSC (que es mayor en estos ratones), sin embargo sería necesario analizar los niveles de la proteína para corroborarlo.

Por otro lado la delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide promueve la inducción de *TGF- β* . Como hemos descrito previamente, *TGF- β* aumenta la probabilidad de introducir mutaciones celulares en un microambiente inflamatorio (Endo et al., 2008; Okazaki et al., 2007), aumenta el reclutamiento de MDSC en el tumor (Safarzadeh et al., 2018) e inhibe el sistema inmune adaptativo. Estos resultados irían en contra con el fenotipo descrito en el caso de los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$. Sin embargo, está descrito que *TGF- β* puede desempeñar una función anti-tumoral dependiendo del estado de desarrollo del tumor, inhibiendo la proliferación de las células tumorales como hemos descrito en nuestros resultados (Datto et al., 1995; Hannon and Beach, 1994; Polyak et al., 1994).

Por último también hemos descrito cómo la delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide promueve la inducción de *CCL25*. Un estudio reciente describe cómo *CCL25* promueve la diferenciación de las células T CD4⁺ en una respuesta de tipo Th1 (Fu et al., 2019), lo que promueve la acción citotóxica de las células T CD8⁺ y se asocia a una mejor prognosis (Galon et al., 2006; Laghi et al., 2009).

1.4. La delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide aumenta la protección de la barrera epitelial, mientras que la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal la reduce.

Por un lado hemos descrito cómo la delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide supone una mayor protección del epitelio intestinal frente al daño. No solo hemos observado cómo los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ sufren una menor pérdida de peso durante el ciclo de DSS, lo que es un marcador de la severidad de la patología (Chassaing et al., 2014), sino que el grado de inflamación, el número de úlceras y el tamaño de las mismas es menor. Efectos similares se han descrito en un modelo de ratón donde se ha delecionado p38 α en la línea mieloide (Youssif et al., 2018), suponiendo esta delección una mayor protección del epitelio frente al daño con DSS. En el estudio previo al desarrollo de la tesis describimos cómo en los ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Del Reino et al., 2014), aunque mostraban una bajada de peso similar a los ratones WT y los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, el número de úlceras y el grado de inflamación respecto al WT es similar a los que muestran los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ respecto a los WT. Esto supone que los ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentan un fenotipo intermedio entre los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, reafirmando la hipótesis de que la delección de p38 γ y p38 δ produce efectos contrarios dependiendo del contexto celular y que en la línea mieloide supone una mayor protección del epitelio intestinal frente al daño.

Por su parte la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal supone una mayor susceptibilidad al daño del epitelio intestinal, ya que debido a su eliminación se generan más úlceras y de mayor tamaño frente a la acción del DSS. La delección de p38 α en el epitelio intestinal desencadena también una

mayor sensibilidad frente al daño epitelial incluso más severa que la que hemos descrito nosotros. Sin embargo, los autores describen cómo dicha sensibilidad se debe a que la eliminación de p38 α supone, a nivel basal, una alteración en el número de células enteroendocrinas, menor producción del moco protector, y alteraciones estructurales en las TJ así como mayor permeabilidad de la barrera epitelial (Gupta et al., 2014). Nuestros resultados no indican que la ausencia de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal altere la morfología de las criptas, la secreción del moco o la expresión de proteínas esenciales que conforman las uniones intercelulares. Tampoco hemos encontrado que existan diferencias basales en la permeabilidad intestinal. Sin embargo el tratamiento con DSS provoca la disrupción de la barrera epitelial en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Aunque no hemos observado alteraciones en las proteínas de las uniones intercelulares entre las células del epitelio intestinal, la anchura de las TJ y la longitud de la zona adherente es mayor en estos ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Esta diferencia en la estructura de las uniones intercelulares del epitelio intestinal de los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, aparentemente no es suficiente para provocar una diferencia en la permeabilidad intestinal en estado basal, pero puede ser la responsable de la mayor disrupción de la barrera epitelial en respuesta al tratamiento con DSS.

Nuestros resultados describen cómo la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal supone un aumento de la apoptosis en las propias células epiteliales. Este aumento en la apoptosis coincide con la disrupción de la barrera epitelial, tal y como ha sido descrito anteriormente (Odenwald and Turner, 2016). A su vez, los resultados obtenidos acerca de la proliferación de las células epiteliales tras el tratamiento, indican que la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal provocan un retraso en los mecanismos de reparación del tejido.

Otros estudios han descrito como la delección de p38 γ en el epitelio intestinal como globalmente supone una reducción en la proliferación de las células del epitelio intestinal (Tomás-Loba et al., 2019; Yin et al., 2015), lo que indicaría que es p38 γ la que participaría en la regulación de la regeneración del tejido.

1.5. La delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide protege el epitelio intestinal del daño inducido por el DSS probablemente mediante el aumento de células del sistema inmune y adaptativo.

Como hemos indicado previamente, los neutrófilos son las primeras células del sistema inmune en acudir al foco del daño (Fournier and Parkos, 2012). Nuestros resultados indican que la delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide aumenta el reclutamiento de los neutrófilos al epitelio intestinal en respuesta al tratamiento. Una de las principales funciones de los neutrófilos es controlar la microbiota infiltrada a través de las úlceras liberando grandes cantidades de ROS (Campregher et al., 2008; Fournier and Parkos, 2012; Mantovani et al., 2008). En otros estudios del grupo hemos descrito cómo la eliminación de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide aumentaba la producción de ROS, y como de esa forma se reducía la infección por *C. albicans* (Alsina-Beauchamp et al., 2018). Estos resultados indican que mediante el mayor reclutamiento de neutrófilos y probablemente la mayor producción de ROS, la eliminación de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide favorece la protección frente a la infección por patógenos producida inicialmente tras el daño en el epitelio intestinal, reduciendo la respuesta inflamatoria posterior que favorece el daño de la barrera epitelial (Ni et al., 2017). Otro punto a tener en cuenta es que un alto ambiente oxidativo debido a la presencia de ROS, como se daría en este caso, está asociado con la iniciación de los procesos tumorales (Grivennikov et

al., 2010). Por tanto el retraso en la aparición de los tumores y su menor crecimiento en los ratones $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$, indicaría la activación de otros mecanismos que protejan de la acumulación de mutaciones o una actividad anti-tumoral más eficiente.

A su vez, los neutrófilos infiltrados participan del reclutamiento de los macrófagos en la segunda oleada del sistema inmune (Fournier and Parkos, 2012). Esto se refleja en nuestros propios resultados puesto que el reclutamiento de macrófagos también se incrementa en los ratones $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ respecto a los ratones WT y los ratones $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$. Además también hemos descrito cómo de las distintas poblaciones de macrófagos analizados, los $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ presentan mayor porcentaje de macrófagos de tipo M2c. Los macrófagos M2c participan de la supresión de la respuesta inmune y favorecen la remodelación tisular (Mantovani et al., 2004; Fernando O Martinez and Gordon, 2014), de modo que la eliminación de $\text{p38}\gamma$ y $\text{p38}\delta$ en la línea mieloide favorecería el control del proceso inflamatorio y la cicatrización del epitelio intestinal dañado mediante el reclutamiento de macrófagos M2c.

Los macrófagos promueven a su vez la expansión de los IELs CD4^+ (Bain and Mowat, 2014; Sujino et al., 2016). Esto justificaría por qué los ratones $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ presentan un mayor porcentaje de IELs CD4^+ que los ratones WT y los ratones $\text{VillinCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$, y por qué, al estar promovida la expansión de los IELs CD4^+ , su relación frente a los IELs CD8^+ es mayor en los ratones $\text{LysCre-p38}\gamma/\delta^{-/-}$ respecto a los otros dos genotipos. Está descrito que los IELs CD4^+ pueden desempeñar un papel protector en el epitelio intestinal en los casos de colitis ulcerosa (Das et al., 2003; Senju et al., 1991; Sujino et al., 2016; Van Kaer and Olivares-Villagómez, 2018), lo que refuerza de nuevo la hipótesis de

que la eliminación de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide promueve la protección del epitelio intestinal mediante el control de la infección microbiana, la regulación de la respuesta inflamatoria, y el favorecimiento de la regeneración del tejido.

1.6. La delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal acentúa el proceso inflamatorio durante la colitis.

En estudios anteriores habíamos descrito cómo p38 γ y p38 δ son necesarias para la producción de las citoquinas IL-1 β e IL-6, citoquinas clásicamente identificadas como pro-inflamatorias (Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017). Mientras que la expresión de IL-1 β e IL-6 se reduce en queratinocitos de ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (KO global) tratados con TPA, al igual que en epitelio intestinal de ratones p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tratados con DSS (Del Reino et al., 2014; Zur et al., 2015), nuestros resultados describen cómo la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal suponen la inducción de estas citoquinas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente acerca del grado de inflamación, apoyando la hipótesis de que la eliminación de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal promueve el proceso inflamatorio.

Por otro lado hemos descrito cómo la delección de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide reduce la inducción de IL-1 β e IL-10, lo cual ya habíamos descrito previamente en el ratón p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ (Risco et al., 2012). Además los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ presentan niveles más bajos de IL-13, tanto a día 0 como en respuesta al tratamiento. La citoquina IL-13, además de ejercer un papel inmunosupresor (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009; Safarzadeh et al., 2018), está relacionada con desarrollo de la colitis a través de la disrupción de las TJ, induciendo la apoptosis de las células epiteliales o promoviendo la cascada

inflamatoria (Hoving, 2018). Estos resultados acerca de la reducción de *IL-1 β* e *IL-13*, apoyan de nuevo la hipótesis sobre que la ausencia de p38 γ y p38 δ en la línea mieloide supone una mayor protección del epitelio intestinal durante la colitis.

1.7. p38 γ y p38 δ regulan la producción de proteínas a distintos niveles.

El análisis de los niveles de distintas proteínas mediante el array nos aportó gran información. Hemos descrito cómo los niveles de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10, que participan en el reclutamiento y diferenciación de células T (Tokunaga et al., 2018), es mayor en los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ respecto a los WT y los VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$, confirmando los datos acerca del reclutamiento celular que hemos obtenido. Hemos descrito que la expresión de IGFBP-1 desciende en los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ y que la expresión de IGFBP-3 sube en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. El papel de las proteínas IGFBP es unirse a IGF-1, regulando su transporte y función (Kim et al., 1997). Está descrito cómo la presencia de IGFBP-3 aumenta la severidad de la colitis o de otras patologías que afectan al epitelio intestinal, ya que al secuestrar a IGF-1 aumenta la apoptosis en las células epiteliales e inhibe la proliferación de las células madre epiteliales, y por tanto la reparación de la barrera epitelial (D'Addio et al., 2015; Yancu et al., 2017). Esto está de acuerdo con nuestros resultados. Hemos descrito cómo los niveles de PTX2 y PTX3 son menores en los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Altos niveles de PTX2 y PTX3 están descritos como marcadores de la severidad de la colitis (Pepys, 2018; Savchenko et al., 2011), por lo que estos resultados indicarían una mejor prognosis en cuanto a la colitis en los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. De ninguna de estas proteínas, cuyos niveles estaban alterados, hemos podido confirmar que p38 γ y p38 δ participen en su regulación a nivel transcripcional, ya que no detectamos

diferencias en los niveles de mRNA. Sin embargo está descrito que p38 γ y p38 δ participan en la regulación de la expresión de proteínas a más niveles a parte del transcripcional, por ejemplo a nivel de síntesis proteica (González-Terán et al., 2013).

Solo en el caso de las osteopontina y CXCL10, nuestros resultados muestran que p38 γ y p38 δ participan en su regulación a nivel transcripcional. Está descrito que la osteopontina se encuentra sobreexpresada en pacientes con IBD (Glas et al., 2011; Masuda et al., 2005) y que además su delección está relacionada con la protección del epitelio intestinal frente al daño por DSS (Zhong et al., 2006). La osteopontina no solo está relacionada con los casos de colitis, sino que también está descrita como un marcador de cáncer de colon y que promueve el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Agrawal et al., 2003; Wu et al., 2014). Nuestros resultados describen cómo tanto los niveles proteicos como los niveles de expresión de su mRNA son mayores en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$. Esto indica por tanto que la delección de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal provoca la regulación positiva a nivel transcripcional de la osteopontina, generando como consecuencia una patología más severa. Vistos estos resultados en el modelo de colitis, sería interesante comprobarlos en el modelo de CAC, de cara a relacionar la mayor proliferación tumoral descrita en los ratones VillinCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ con una mayor expresión de osteopontina.

En el caso de CXCL10 también hay una correlación ya que nuestros resultados describen como se induce la expresión de su mRNA en los ratones LysCre-p38 $\gamma/\delta^{-/-}$ tras el tratamiento con DSS, lo que corresponde con un aumento de los niveles de CXCL10 detectados en el array. Estos resultados, a su vez,

coinciden con el aumento en el reclutamiento de células T que presentan los ratones LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$.

1.8. Modelo de progresión de colitis y CAC en los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$ y LysCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$.

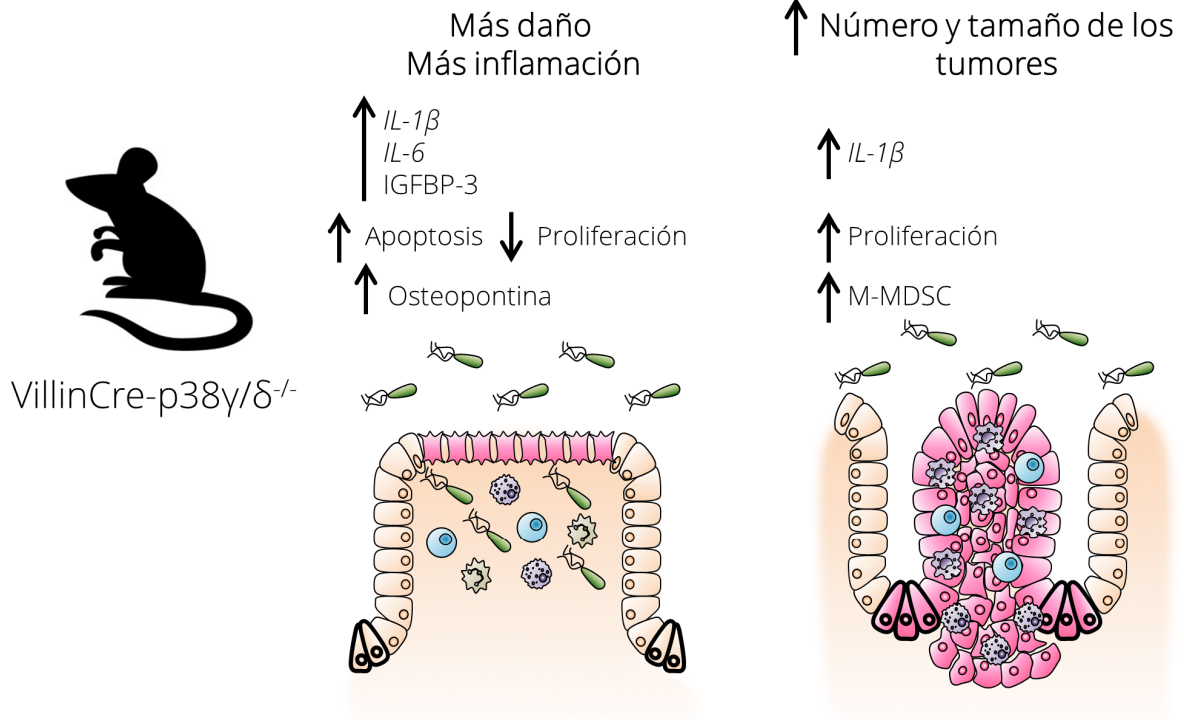
Después de analizar todos los resultados obtenidos hemos hipotetizado dos modelos distintos de cómo se desarrollan la colitis y el CAC para los casos en que se ha delecionado p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal o en la línea mieloide.

En el caso de los ratones VillinCre-p38 γ / $\delta^{-/-}$, aquellos en los que están delecionadas p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal, sufren una patología más severa durante la colitis. Cuando el epitelio intestinal es dañado se da una respuesta inflamatoria más aguda caracterizada por la inducción de *IL-1 β* e *IL-6*. Junto con la inducción de estas citoquinas aumentara la expresión de osteopontina, que potenciará la respuesta inflamatoria. La exacerbada respuesta inflamatoria y el defecto en las uniones intercelulares del epitelio intestinal provocarían una mayor disrupción la barrera epitelial, y con el aumento de IGFBP-3 se alterarían los procesos apoptóticos y proliferativos de las células del epitelio intestinal. Todos estos fenómenos redundarían en un mayor daño tisular. La mayor destrucción del epitelio intestinal ante cada ciclo de desepitelización y reepitelización es una ventaja evolutiva para las células madre mutante epiteliales, que repoblarán el tejido dañado con sus células descendientes mutantes hasta la generación de un adenocarcinoma. Una vez establecido el tumor, el continuo microambiente inflamatorio y el mayor reclutamiento de M-MDSC, favorecerían la supervivencia y progresión del tumor, incrementando la proliferación de las células neoplásicas (Fig D1A).

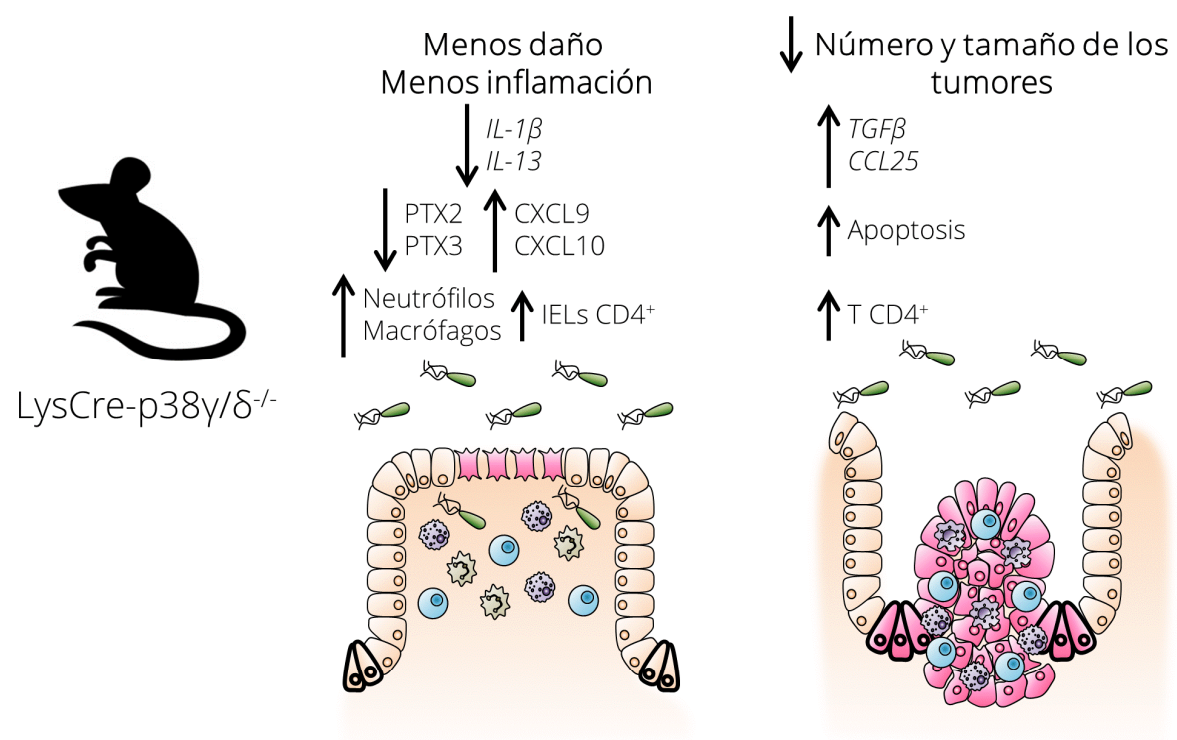
Por su parte los ratones *LysCre-p38γ/δ^{-/-}*, aquellos en los que están delecionadas *p38γ* y *p38δ* en la línea mieloide, sufren una patología menos grave durante la colitis. Cuando el epitelio intestinal es dañado, la rápida acción de los neutrófilos en el foco del daño, podría controlar la entrada de la microbiota desde la luz, reduciendo la necesidad de una fuerte respuesta inflamatoria. Controlada en mayor o menor medida la situación, la llegada de las consecuentes poblaciones celulares del sistema inmune innato o adaptativo colaborarían en el mantenimiento de la homeostasis y la regeneración del tejido. La mejor respuesta y evolución del epitelio intestinal en cada ciclo de desepitelización y reepitelización retrasaría la aparición de focos tumorales. Con la aparición de los primeros tumores tempranos, la inducción de *TGFβ* reduce la proliferación del tumor, mientras que la inducción de *CCL25* incrementa el reclutamiento de células T *CD4⁺*, que favorecen la acción anti-tumoral aumentando la apoptosis de las células tumorales (Fig D1B).

Fig D1: Modelo de la progresión de colitis y CAC en los ratones *VillinCre-p38γ/δ^{-/-}* y *LysCre-p38γ/δ^{-/-}*; (A) Durante la colitis, se da respuesta inflamatoria mayor en los ratones *VillinCre-p38γ/δ^{-/-}* en la que se ve implicada la inducción de *IL-1β*, *IL-6*, osteopontina e IGFBP-3. El mayor daño tisular, favorecido por el defecto en las uniones intercelulares del epitelio intestinal, está acompañado de una mayor disrupción de la barrera epitelial, y mayor apoptosis y menor proliferación de las células epiteliales. Los tumores generados en el epitelio intestinal, favorecidos por las condiciones dadas durante la colitis, promoverán el mantenimiento de un microambiente inflamatorio, mediante la inducción de *IL-1β*, y la inhibición de la actividad anti-tumoral, con el reclutamiento de M-MDSC. Estos factores contribuirán a la tumorigénesis promoviendo la proliferación de las células tumorales. **(B)** Durante la colitis, la acción temprana de los neutrófilos en los ratones *LysCre-p38γ/δ^{-/-}* permitirá que la respuesta inflamatoria esté más controlada, minimizando el daño epitelial, y favoreciendo el reclutamiento de células que mantengan la homeostasis. La inducción de *TGFβ* durante los primeros estadios del desarrollo tumoral y la inducción de *CCL25* para el reclutamiento de células T *CD4⁺*, favorecerán la actividad anti-tumoral y promoverá a apoptosis de las células tumorales.

A



B



- Linfocitos intraepiteliales
 Microbiota
 Macrófago
 Neutrófilo
- Célula epitelial
 Célula madre epitelial
 úlcera
- Célula mutante epitelial
 Célula madre mutante epitelial
 MDSC

Conclusiones

Conclusiones.

1. p38 γ y p38 δ regulan los procesos asociados al desarrollo de la colitis y del cáncer de colon asociado a colitis (CAC) y lo hacen de distinta manera dependiendo del compartimento celular donde se expresen.
2. La eliminación de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal promueve los procesos inflamatorios que participan en el desarrollo de la colitis y del CAC, posiblemente a través del incremento de la producción citoquinas pro-inflamatorias como las *IL-1 β* o *IL-6*.
3. La eliminación de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal exacerba el daño producido en el epitelio intestinal durante la colitis, promoviendo la apoptosis de las células del epitelio intestinal y reduciendo la proliferación de las células en la base de las criptas.
4. La eliminación de p38 γ y p38 δ en el epitelio intestinal promueve la tumorigénesis durante el desarrollo del CAC, aumentando la proliferación de las células neoplásicas, probablemente mediante el reclutamiento de M-MDSC.
5. La eliminación de p38 γ y p38 δ en las células de la línea mieloide protege al epitelio intestinal del daño causado durante la colitis, probablemente a través de la producción de quimioquinas tales como CXCL10 o CXCL9, que promueven el reclutamiento de distintas poblaciones celulares del sistema inmune innato y adaptativo.

6. La eliminación de p38 γ y p38 δ en las células de la línea mieloide reduce la tumorigénesis durante el desarrollo del CAC, promoviendo la apoptosis de las células neoplásicas, presumiblemente mediante un mayor reclutamiento de células T CD4⁺.

Referencias

Referencias

- Agrawal, D., Chen, T., Irby, R., Quackenbush, J., Chambers, A.F., Szabo, M., Cantor, A., Coppola, D., Yeatman, T.J., 2003. Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C. R. Biol.* 326, 1041–1043.
- Alsina-Beauchamp, D., Escós, A., Fajardo, P., González-Romero, D., Díaz-Mora, E., Risco, A., Martín-Serrano, M.A., del Fresno, C., Dominguez-Andrés, J., Aparicio, N., Zur, R., Shpiro, N., Brown, G.D., Ardavín, C., Netea, M.G., Alemany, S., Sanz-Ezquerro, J.J., Cuenda, A., 2018. Myeloid cell deficiency of p38 γ /p38 δ protects against candidiasis and regulates antifungal immunity. *EMBO Mol. Med.* 10, e8485. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708485>
- Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Vaisman, N., Segal, E., Rechavi, G., Alon, U., Mills, G.B., Domany, E., Yarden, Y., 2007. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* 39, 503–512. <https://doi.org/10.1038/ng1987>
- Bain, C.C., Mowat, A.McI., 2014. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* 260, 102–117. <https://doi.org/10.1111/imr.12192>
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357, 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0)
- Barker, N., Es, J., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., J Peters, P., Clevers, H., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene LGR5. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Biswas, S.K., Allavena, P., Mantovani, A., 2013. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin. Immunopathol.* 35, 585–600. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0367-7>
- Bollrath, J., Phesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, Ö., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R.M., Kirchner, T., Arkan, M.C., Ernst, M., Greten, F.R., 2009. gp130-Mediated Stat3 Activation in Enterocytes Regulates Cell Survival and Cell-Cycle Progression during Colitis-Associated Tumorigenesis. *Cancer Cell* 15, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.002>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bui, J.D., Schreiber, R.D., 2007. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* 19, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.001>

- Campregher, C., Luciani, M.G., Gasche, C., 2008. Activated neutrophils induce an hMSH2-dependent G2/M checkpoint arrest and replication errors at a (CA)₁₃-repeat in colon epithelial cells. *Gut* 57, 780–787. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.141556>
- Cerezo-Guisado, M.I., del Reino, P., Remy, G., Kuma, Y., Arthur, J.S.C., Gallego-Ortega, D., Cuenda, A., 2011. Evidence of p38 γ and p38 δ involvement in cell transformation processes. *Carcinogenesis* 32, 1093–1099. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr079>
- Chassaing, B., Aitken, J.D., Malleshappa, M., Vijay-Kumar, M., 2014. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol.* 104, Unit-15.25. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>
- Cheroutre, H., Lambolez, F., Mucida, D., 2011. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 445–456. <https://doi.org/10.1038/nri3007>
- Choi, C.-H.R., Bakir, I.A., Hart, A.L., Graham, T.A., 2017. Clonal evolution of colorectal cancer in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Amp Hepatol.* 14, 218.
- Chun, E., Lavoie, S., Michaud, M., Gallini, C.A., Kim, J., Soucy, G., Odze, R., Glickman, J.N., Garrett, W.S., 2015. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Rep.* 12, 244–257. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.024>
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
- Cortez-Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Rauch, P.J., Chudnovskiy, A., Berger, C., Ryan, R.J.H., Iwamoto, Y., Marinelli, B., Gorbатов, R., Forghani, R., Novobrantseva, T.I., Koteliensky, V., Figueiredo, J.-L., Chen, J.W., Anderson, D.G., Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Weissleder, R., Pittet, M.J., 2012. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 2491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113744109>
- Criado, G., Risco, A., Alsina-Beauchamp, D., Pérez-Lorenzo, M.J., Escós, A., Cuenda, A., 2014. Alternative p38 MAPKs Are Essential for Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 66, 1208–1217. <https://doi.org/10.1002/art.38327>
- Cuadrado, A., Nebreda, A.R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429, 403. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
- Cuenca, A., Delano, M., Kelly-Scumpia, K., Moreno, C., Scumpia, P., LaFace, D., Heyworth, P., Efron, P., Moldawer, L., 2010. A Paradoxical Role for Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis and Trauma. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00178>

- Cuenda, A., Rousseau, S., 2007. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Mitogen-Act. Protein Kinases New Insights Regul. Funct. Role Hum. Dis.* 1773, 1358–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>
- Cuenda, A., Sanz-Ezquerro, J.J., 2017. p38 γ and p38 δ : From Spectators to Key Physiological Players. *Trends Biochem. Sci.* 42, 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.008>
- D'Addio, F., La Rosa, S., Maestroni, A., Jung, P., Orsenigo, E., Ben Nasr, M., Tezza, S., Bassi, R., Finzi, G., Marando, A., Vergani, A., Frego, R., Albarello, L., Andolfo, A., Manuguerra, R., Viale, E., Staudacher, C., Corradi, D., Batlle, E., Breault, D., Secchi, A., Folli, F., Fiorina, P., 2015. Circulating IGF-I and IGFBP3 Levels Control Human Colonic Stem Cell Function and Are Disrupted in Diabetic Enteropathy. *Cell Stem Cell* 17, 486–498. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.010>
- Das, G., Augustine, M.M., Das, J., Bottomly, K., Ray, P., Ray, A., 2003. An important regulatory role for CD4⁺CD8 α T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5324. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831037100>
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y., Wang, X.F., 1995. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 5545. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5545>
- De Sanctis, F., Solito, S., Ugel, S., Molon, B., Bronte, V., Marigo, I., 2016. MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1865, 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.001>
- Del Reino, P., Alsina-Beauchamp, D., Escós, A., Cerezo-Guisado, M.I., Risco, A., Aparicio, N., Zur, R., Fernandez-Estévez, M., Collantes, E., Montans, J., Cuenda, A., 2014. Pro-oncogenic role of alternative p38 mitogen-activated protein kinases p38 γ and p38 δ , linking inflammation and cancer in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res.* 74, 6150–6160. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0870>
- Diefenbach, A., Colonna, M., Koyasu, S., 2014. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* 41, 354–365. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.005>
- Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Fernandez Gomez, A., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiai, E., Casati, A., Grassi, F., Bronte, V., 2009. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* 40, 22–35. <https://doi.org/10.1002/eji.200939903>
- Eaden, J.A., Abrams, K.R., Mayberry, J.F., 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535.

- Elinav, E., Nowarski, R., Thaïss, C.A., Hu, B., Jin, C., Flavell, R.A., 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer* 13, 759.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kou, T., Nakase, H., Fujii, S., Fujimori, T., Kinoshita, K., Honjo, T., Chiba, T., 2008. Activation-Induced Cytidine Deaminase Links Between Inflammation and the Development of Colitis-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology* 135, 889-898.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.091>
- Escós, A., Risco, A., Alsina-Beauchamp, D., Cuenda, A., 2016. p38 γ and p38 δ Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs), New Stars in the MAPK Galaxy. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 31. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00031>
- Facciabene, A., Motz, G., Coukos, G., 2012. T-Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3687>
- Fournier, B.M., Parkos, C.A., 2012. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 5, 354.
- Fu, H., Jangani, M., Parmar, A., Wang, G., Coe, D., Spear, S., Sandrock, I., Capasso, M., Coles, M., Cornish, G., Helmbly, H., Marelli-Berg, F.M., 2019. A Subset of CCL25-Induced Gut-Homing T Cells Affects Intestinal Immunity to Infection and Cancer. *Front. Immunol.* 10, 271. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00271>
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., Colonna, M., 2013. Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity* 38, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.010>
- Gabrilovich, D., Nagaraj Bharadwaj, S., 2009. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162-174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V., 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
- Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O., Durandy, A., 1999. TGF- β 1 Prevents the Noncognate Maturation of Human Dendritic Langerhans Cells. *J. Immunol.* 162, 4567.

- Glas, J., Seiderer, J., Bayrle, C., Wetzke, M., Fries, C., Tillack, C., Olszak, T., Beigel, F., Steib, C., Friedrich, M., Diegelmann, J., Czamara, D., Brand, S., 2011. The Role of Osteopontin (OPN/SPP1) Haplotypes in the Susceptibility to Crohn's Disease. *PLOS ONE* 6, e29309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029309>
- González-Terán, B., Cortés, J.R., Manieri, E., Matesanz, N., Verdugo, Á., Rodríguez, M.E., González-Rodríguez, Á., Valverde, Á., Martín, P., Davis, R.J., Sabio, G., 2013. Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF- α translation in LPS-induced hepatitis. *J. Clin. Invest.* 123, 164–178. <https://doi.org/10.1172/JCI65124>
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., Karin, M., 2009. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* 15, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grivennikov, S.I., Karin, M., 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.005>
- Gupta, J., del Barco Barrantes, I., Igea, A., Sakellariou, S., Pateras, I.S., Gorgoulis, V.G., Nebreda, A.R., 2014. Dual Function of p38 α MAPK in Colon Cancer: Suppression of Colitis-Associated Tumor Initiation but Requirement for Cancer Cell Survival. *Cancer Cell* 25, 484–500. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.019>
- Guttman, J.A., Finlay, B.B., 2009. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.028>
- Hajdu, S.I., 2004. Greco-Roman thought about cancer. *Cancer* 100, 2048–2051. <https://doi.org/10.1002/cncr.20198>
- Hannon, G.J., Beach, D., 1994. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257–261. <https://doi.org/10.1038/371257a0>
- Harpaz, N., Polydorides, A.D., 2010. Colorectal Dysplasia in Chronic Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Clinical Implications, and Pathogenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134, 876–895. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-134.6.876>
- Haverkamp, J.M., Crist, S.A., Elzey, B.D., Cimen, C., Ratliff, T.L., 2011. In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. *Eur. J. Immunol.* 41, 749–759. <https://doi.org/10.1002/eji.201041069>

- Haverkamp, J.M., Smith, A.M., Weinlich, R., Dillon, C.P., Qualls, J.E., Neale, G., Koss, B., Kim, Y., Bronte, V., Herold, M.J., Green, D.R., Opferman, J.T., Murray, P.J., 2014. Myeloid-Derived Suppressor Activity Is Mediated by Monocytic Lineages Maintained by Continuous Inhibition of Extrinsic and Intrinsic Death Pathways. *Immunity* 41, 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.020>
- Hoving, J.C., 2018. Targeting IL-13 as a Host-Directed Therapy Against Ulcerative Colitis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 395–395. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00395>
- Hu, M.D., Edelblum, K.L., 2017. Sentinels at the frontline: the role of intraepithelial lymphocytes in inflammatory bowel disease. *Curr. Pharmacol. Rep.* 3, 321–334. <https://doi.org/10.1007/s40495-017-0105-2>
- Huang, Y., Park, Y., Wang-Zhu, Y., Larange, A., Arens, R., Bernardo, I., Olivares-Villagómez, D., Herndler-Brandstetter, D., Abraham, N., Grubeck-Loebenstien, B., Schoenberger, S.P., Van Kaer, L., Kronenberg, M., Teitell, M.A., Cheroutre, H., 2011. Mucosal memory CD8⁺ T cells are selected in the periphery by an MHC class I molecule. *Nat. Immunol.* 12, 1086.
- Humphries, A., Wright, N.A., 2008. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 415.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C., 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 276–285. <https://doi.org/10.1038/nrc1046>
- Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T., Srikrishna, G., 2011. S100A8/A9 Activate Key Genes and Pathways in Colon Tumor Progression. *Mol. Cancer Res.* 9, 133. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0394>
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Struhl, K., 2009. An Epigenetic Switch Involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell* 139, 693–706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
- Ismail, A.S., Severson, K.M., Vaishnava, S., Behrendt, C.L., Yu, X., Benjamin, J.L., Ruhn, K.A., Hou, B., DeFranco, A.L., Yarovinsky, F., Hooper, L.V., 2011. $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 8743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019574108>
- Kanayama, M., Xu, S., Danzaki, K., Gibson, J.R., Inoue, M., Gregory, S.G., Shinohara, M.L., 2017. Skewing of the population balance of lymphoid and myeloid cells by secreted and intracellular osteopontin. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni.3791>
- Kanneganti, M., Mino-Kenudson, M., Mizoguchi, E., 2011. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 342637. <https://doi.org/10.1155/2011/342637>

- Kim, H.-S., Rosenfeld, R.G., Oh, Y., 1997. Biological roles of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). *Exp. Mol. Med.* 29, 85–96. <https://doi.org/10.1038/emm.1997.13>
- Kowanetz, M., Wu, X., Lee, J., Tan, M., Hagenbeek, T., Qu, X., Yu, L., Ross, J., Korsisaari, N., Cao, T., Bou-Reslan, H., Kallop, D., 2010. Inaugural Article: Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015855107>
- Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Márquez, R., Cuenda, A., 2005. BIRB796 Inhibits All p38 MAPK Isoforms in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 19472–19479. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414221200>
- Kumar, A.A., Delgado, A.G., Piazzuelo, M.B., Van Kaer, L., Olivares-Villagómez, D., 2017. Innate CD8αα+ lymphocytes enhance anti-CD40 antibody-mediated colitis in mice. *Immun. Inflamm. Dis.* 5, 109–123. <https://doi.org/10.1002/iid3.146>
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., Gabrilovich, D., 2016. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
- Laghi, L., Bianchi, P., Miranda, E., Balladore, E., Pacetti, V., Grizzi, F., Allavena, P., Torri, V., Repici, A., Santoro, A., Mantovani, A., Roncalli, M., Malesci, A., 2009. CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. *Lancet Oncol.* 10, 877–884. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70186-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70186-X)
- Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S.K., Hart, A.L., Knight, S.C., Ciclitira, P.J., Al-Hassi, H.O., 2016. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 3117. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i11.3117>
- Lasry, A., Zinger, A., Ben-Neriah, Y., 2016. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat. Immunol.* 17, 230.
- Liang, J., Nagahashi, M., Kim, E.Y., Harikumar, K.B., Yamada, A., Huang, W.-C., Hait, N.C., Allegood, J.C., Price, M.M., Avni, D., Takabe, K., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2013. Sphingosine-1-Phosphate Links Persistent STAT3 Activation, Chronic Intestinal Inflammation, and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* 23, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.013>
- Lin, W.-W., Karin, M., 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 1175–1183. <https://doi.org/10.1172/JCI31537>
- Liu, Y., Cao, X., 2015. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 1–4. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.83>

- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Martinez, Fernando O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Martinez, Fernando O, Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13–13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Masopust, D., Choo, D., Vezys, V., Wherry, E.J., Duraiswamy, J., Akondy, R., Wang, J., Casey, K.A., Barber, D.L., Kawamura, K.S., Fraser, K.A., Webby, R.J., Brinkmann, V., Butcher, E.C., Newell, K.A., Ahmed, R., 2010. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* 207, 553–564. <https://doi.org/10.1084/jem.20090858>
- Masopust, D., Jiang, J., Shen, H., Lefrançois, L., 2001a. Direct Analysis of the Dynamics of the Intestinal Mucosa CD8 T Cell Response to Systemic Virus Infection. *J. Immunol.* 166, 2348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2348>
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., Lefrançois, L., 2001b. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science* 291, 2413. <https://doi.org/10.1126/science.1058867>
- Masuda, H., Takahashi, Y., Asai, S., Hemmi, A., Takayama, T., 2005. Osteopontin expression in ulcerative colitis is distinctly different from that in Crohn's disease and diverticulitis. *J. Gastroenterol.* 40, 409–413. <https://doi.org/10.1007/s00535-005-1567-2>
- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M.C., Bain, C., Favrot, M.C., Caux, C., Blay, J.Y., 1998. Inhibition of the Differentiation of Dendritic Cells From CD34⁺ Progenitors by Tumor Cells: Role of Interleukin-6 and Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 92, 4778.
- Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., Bhan, A.K., Tonegawa, S., 1993. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 75, 275–282. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80069-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80069-Q)
- Mosesson, Y., Mills, G.B., Yarden, Y., 2008. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 835–850. <https://doi.org/10.1038/nrc2521>

- Murdoch, C., Giannoudis, A., Lewis, C., 2004. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1109>
- Nagaraj, S., Schrum, A.G., Cho, H.-I., Celis, E., Gabrilovich, D.I., 2010. Mechanism of T Cell Tolerance Induced by Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Immunol.* 184, 3106. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902661>
- Ni, J., Wu, G.D., Albenberg, L., Tomov, V.T., 2017. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Amp Hepatol.* 14, 573.
- Odenwald, M.A., Turner, J.R., 2016. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat. Rev. Gastroenterol. Amp Hepatol.* 14, 9.
- Okazaki, I., Kotani, A., Honjo, T., 2007. Role of AID in Tumorigenesis, in: *Advances in Immunology*. Elsevier, pp. 245–273. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)94008-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)94008-5)
- Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., 2009. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *J. Immunol.* 182, 4499. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>
- Pan, P.-Y., Ma, G., Weber, K.J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C.M., Chen, S.-H., 2010. Immune Stimulatory Receptor CD40 Is Required for T-Cell Suppression and T Regulatory Cell Activation Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Cancer Res.* 70, 99–108. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1882>
- Pepys, M.B., 2018. The Pentraxins 1975-2018: Serendipity, Diagnostics and Drugs. *Front. Immunol.* 9, 2382–2382. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02382>
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., Koff, A., 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8, 9–22. <https://doi.org/10.1101/gad.8.1.9>
- Poussier, P., Ning, T., Banerjee, D., Julius, M., 2002. A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity. *J. Exp. Med.* 195, 1491–1497. <https://doi.org/10.1084/jem.20011793>
- Prahalad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., Bernards, R., 2012. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483, 100–103. <https://doi.org/10.1038/nature10868>
- Risco, A., Cuenda, A., 2012. New Insights into the p38γ and p38δ MAPK Pathways. *J. Signal Transduct.* 2012, 520289–520289. <https://doi.org/10.1155/2012/520289>
- Risco, A., del Fresno, C., Mambol, A., Alsina-Beauchamp, D., MacKenzie, K.F., Yang, H.-T., Barber, D.F., Morcelle, C., Arthur, J.S.C., Ley, S.C., Ardavin, C., Cuenda, A., 2012. p38γ and p38δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein

- kinase pathway activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11200.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1207290109>
- Risco, A., Martin-Serrano, M.A., Barber, D.F., Cuenda, A., 2018. p38 γ and p38 δ Are Involved in T Lymphocyte Development. *Front. Immunol.* 9, 65.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00065>
- Ritsma, L., Ellenbroek, S., Zomer, A., J Snippert, H., J de Sauvage, F., D Simons, B., Clevers, H., van Rheenen, J., 2014. Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging.
<https://doi.org/10.1038/nature12972>
- Roberts, S.J., Smith, A.L., West, A.B., Wen, L., Findly, R.C., Owen, M.J., Hayday, A.C., 1996. T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11774–11779.
- Sabio, G., Arthur, J.S.C., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N.A., Cuenda, A., 2005. p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *EMBO J.* 24, 1134–1145.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600578>
- Safarzadeh, E., Orangi, M., Mohammadi, H., Babaie, F., Baradaran, B., 2018. Myeloid-derived suppressor cells: Important contributors to tumor progression and metastasis. *J. Cell. Physiol.* 233, 3024–3036.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26075>
- Savchenko, A.S., Inoue, A., Ohashi, R., Jiang, S., Hasegawa, G., Tanaka, T., Hamakubo, T., Kodama, T., Aoyagi, Y., Ushiki, T., Naito, M., 2011. Long pentraxin 3 (PTX3) expression and release by neutrophils in vitro and in ulcerative colitis. *Pathol. Int.* 61, 290–297.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2011.02651.x>
- Schneider, M.R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trülzsch, K., Müller-Höcker, J., Vogelmann, R., Allgäuer, M., Gerhard, M., Steininger, S., Wolf, E., Kolligs, F.T., 2010. A Key Role for E-cadherin in Intestinal Homeostasis and Paneth Cell Maturation. *PLOS ONE* 5, e14325.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014325>
- Senju, M., Wu, K.C., Mahida, Y.R., Jewell, D.P., 1991. Coexpression of CD4 and CD8 on peripheral blood T cells and lamina propria T cells in inflammatory bowel disease by two colour immunofluorescence and flow cytometric analysis. *Gut* 32, 918.
<https://doi.org/10.1136/gut.32.8.918>
- Singh, B., Vincent, L., Berry, J.A., Multani, A.S., Lucci, A., 2007. Cyclooxygenase-2 Expression Induces Genomic Instability in MCF10A Breast Epithelial Cells. *J. Surg. Res.* 140, 220–226.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.01.039>

- Snider, A.J., Bialkowska, A.B., Ghaleb, A.M., Yang, V.W., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 2016. Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1438, 245–254. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8_14
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., n.d. Interleukin-10-Treated Human Dendritic Cells Induce a Melanoma-Antigen-Specific Anergy in CD8⁺ T Cells Resulting in a Failure to Lyse Tumor Cells 10.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Chapman, P.B., Solit, D.B., Ribas, A., Lo, R.S., Flaherty, K.T., Ogino, S., Wargo, J.A., Golub, T.R., 2012. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500–504. <https://doi.org/10.1038/nature11183>
- Sujino, T., London, M., Hoytema van Konijnenburg, D.P., Rendon, T., Buch, T., Silva, H.M., Lafaille, J.J., Reis, B.S., Mucida, D., 2016. Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4⁺ T cells controls gut inflammation. *Science* 352, 1581. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3892>
- Suzuki, S., Sugahara, S., Shimizu, T., Tada, T., Minagawa, M., Maruyama, S., Watanabe, H., Saito, H., Ishikawa, H., Hatakeyama, K., Abo, T., 1998. Low level of mixing of partner cells seen in extrathymic T cells in the liver and intestine of parabiotic mice: its biological implication. *Eur. J. Immunol.* 28, 3719–3729. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199811\)28:11<3719::AID-IMMU3719>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3719::AID-IMMU3719>3.0.CO;2-O)
- Swann, J.B., Vesely, M.D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2008. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 652–656. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708594105>
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M.D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., Lenz, H.-J., 2018. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* 63, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.007>
- Tomás-Loba, A., Manieri, E., González-Terán, B., Mora, A., Leiva-Vega, L., Santamans, A.M., Romero-Becerra, R., Rodríguez, E., Pintor-Chocano, A., Feixas, F., López, J.A., Caballero, B., Trakala, M., Blanco, Ó., Torres, J.L., Hernández-Cosido, L., Montalvo-Romeral, V., Matesanz, N., Roche-Molina, M., Bernal, J.A., Mischo, H., León, M., Caballero, A., Miranda-Saavedra, D., Ruiz-Cabello, J., Nevzorova, Y.A., Cubero, F.J., Bravo, J., Vázquez, J., Malumbres, M., Marcos, M., Osuna, S., Sabio, G., 2019. p38γ is essential for cell cycle progression and liver tumorigenesis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1112-8>
- Toyonaga, T., Nakase, H., Ueno, S., Matsuura, M., Yoshino, T., Honzawa, Y., Itou, A., Namba, K., Minami, N., Yamada, S., Koshikawa, Y., Uede, T., Chiba, T.,

- Okazaki, K., 2015. Osteopontin Deficiency Accelerates Spontaneous Colitis in Mice with Disrupted Gut Microbiota and Macrophage Phagocytic Activity. *PLOS ONE* 10, e0135552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135552>
- Van Kaer, L., Olivares-Villagómez, D., 2018. Development, Homeostasis, and Functions of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. *J. Immunol.* 200, 2235–2244. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701704>
- Vermeulen, L., J Snippert, H., 2014. Vermeulen L, Snippert HJ Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat Rev Cancer* 14: 468–480. <https://doi.org/10.1038/nrc3744>
- Waldner, M.J., Neurath, M.F., 2009. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin. Immunopathol.* 31, 249–256. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0161-8>
- Wilson, T.R., Fridlyand, J., Yan, Y., Penuel, E., Burton, L., Chan, E., Peng, J., Lin, E., Wang, Y., Sosman, J., Ribas, A., Li, J., Moffat, J., Sutherlin, D.P., Koeppen, H., Merchant, M., Neve, R., Settleman, J., 2012. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 487, 505–509. <https://doi.org/10.1038/nature11249>
- Wu, X.-L., Lin, K.-J., Bai, A.-P., Wang, W.-X., Meng, X.-K., Su, X.-L., Hou, M.-X., Dong, P.-D., Zhang, J.-J., Wang, Z.-Y., Shi, L., 2014. Osteopontin knockdown suppresses the growth and angiogenesis of colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 20, 10440–10448. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10440>
- Yancu, D., Blouin, M.-J., Birman, E., Florianova, L., Aleynikova, O., Zakikhani, M., VanderMeulen, H., Seidman, E., Pollak, M., 2017. A phenotype of IGFBP-3 knockout mice revealed by dextran sulfate-induced colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 32, 146–153. <https://doi.org/10.1111/jgh.13461>
- Yin, N., Qi, X., Tsai, S., Lu, Y., Basir, Z., Oshima, K., Thomas, J.P., Myers, C.R., Stoner, G., Chen, G., 2015. p38 γ MAPK is required for inflammation-associated colon tumorigenesis. *Oncogene* 35, 1039.
- Youn, J.-I., Gabrilovich, D.I., 2010. The biology of myeloid-derived suppressor cells: The blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur. J. Immunol.* 40, 2969–2975. <https://doi.org/10.1002/eji.201040895>
- Youssif, C., Cubillos-Rojas, M., Comalada, M., Llonch, E., Perna, C., Djouder, N., Nebreda, A.R., 2018. Myeloid p38 α signaling promotes intestinal IGF-1 production and inflammation-associated tumorigenesis. *EMBO Mol. Med.* 10, e8403. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708403>
- Yu, H., Kortylewski, M., Pardoll, D., 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment: Tumour immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 41–51. <https://doi.org/10.1038/nri1995>

- Yu, H., Pardoll, D., Jove, R., 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798–809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>
- Zhao, Yang, Wu, T., Shao, S., Shi, B., Zhao, Yong, 2016. Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *OncoImmunology* 5, e1004983. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1004983>
- Zhong, J., Eckhardt, E., Oz, H., Bruemmer, D., de Villiers, W., 2006. Osteopontin deficiency protects mice from Dextran sodium sul-fate-induced colitis. <https://doi.org/10.1097/00054725-200608000-00015>
- Zur, R., Garcia-Ibanez, L., Nunez-Buiza, A., Aparicio, N., Liappas, G., Escós, A., Risco, A., Page, A., Saiz-Ladera, C., Alsina-Beauchamp, D., Montans, J., Paramio, J.M., Cuenda, A., 2015. Combined deletion of p38 γ and p38 δ reduces skin inflammation and protects from carcinogenesis. *Oncotarget* 6, 12920–12935.